



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA ANIMAL, BIOLOXÍA VEXETAL E
ECOLOXÍA

”CARACTERIZACIÓN DE LAS LIGNINAS DE HELECHOS Y ESTUDIO DE SUS RELACIONES FILOGENÉTICAS CON OTRAS PLANTAS VASCULARES TERRESTRES”

Memoria presentada por el
Lcdo. José Manuel Espiñeira Illobre
para aspirar al grado de Doctor

A Coruña, 2008

D. JOSÉ MIGUEL RUÍZ DE LA ROSA, director del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña

CERTIFICA:

Que la presente memoria, titulada **"Caracterización de las ligninas de helechos y estudio de sus relaciones filogenéticas con otras plantas vasculares terrestres"** y presentada por el licenciado JOSÉ MANUEL ESPÍÑEIRA ILLOBRE para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña en colaboración con el Departamento de Biología Vegetal (U.D. Fisiología Vegetal) de la Universidad de Murcia.

Y para que conste firma la presente certificación en A Coruña a 5 de mayo de 2008.

Fdo.: José Miguel Ruíz de la Rosa

D. ALFONSO ROS BARCELÓ catedrático de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Murcia, M^a ÁNGELES BERNAL PITA DA VEIGA, profesora titular del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña y D. FEDERICO POMAR BARBEITO profesor contratado Doctor del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada **"Caracterización de las ligninas de helechos y estudio de sus relaciones filogenéticas con otras plantas vasculares terrestres"** y presentada por el licenciado JOSÉ MANUEL ESPÍÑEIRA ILLOBRE, ha sido realizada bajo su dirección, y que cumple las condiciones exigidas para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste firman la presente certificación en A Coruña a 5 de mayo de 2008.



Alfonso Ros Barceló

M^a Ángeles Bernal Pita da Veiga

Federico Pomar Barbeito

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña, en colaboración con el Departamento de Biología Vegetal (U.D. Fisiología Vegetal) de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, y ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BOS2002-03550), el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-11577)-FEDER (EU), la Xunta de Galicia (PGIDIT-04RAG-503018PR) y por la Fundación Séneca (CCAA Murcia) (00545/PI/04).

Los resultados de la presente Memoria han sido incluidos en los siguientes trabajos de investigación:

Artículos originales de investigación

Gómez-Ros LV, Espiñeira JM, Pomar F, Núñez-Flores MJL, Ros Barceló A (2007)
p-Hydroxycinnamyl aldehydes in lignifying plant cell walls. Arch Organ Chem vii:167-171.

Gómez-Ros LV, Espiñeira JM, Pomar F, Merino F, Cuello J, Ros Barceló A (2007)
The monomer composition controls the $\Sigma \beta\text{-O-4}/\Sigma \text{O-4}$ end monomer ratio of the linear lignin fraction. J Wood Sci.

Comunicaciones a congresos

Espiñeira JM, Gómez-Ros LV, Pomar F, Merino F, Cuello J y Ros Barceló A. The monomer composition controls the $\Sigma \beta\text{-O-4}/\Sigma \text{O-4}$ end monomer ratio of the linear lignin fraction. Comunicación "XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal". Alcalá de Henares, 18-21 Septiembre 2007.

Es en este momento, cuando pienso en todas aquellas personas que me han ayudado en la elaboración de esta tesis, cuando más consciente soy de que, sin ellas, no habría sido posible terminarla. No importa el grado, todas las colaboraciones, todas las ayudas, fueron fundamentales.

¿Por dónde, y por quién, empezar?...

... por mis directores, los doctores Alfonso Ros, Ángeles Bernal y Federico Pomar. ¡Qué valor!, confiar en que alguien con mis limitaciones de tiempo -y yo que sé cuántas otras- podía llevar "esto" hasta el final. Creo, no, ¡sé!, que, ya desde hace tiempo, son mucho más, son mis amigos. Amigos de conversación, amigos de deporte, amigos de aficiones, ... ¡amigos!

... por la doctora Fuencisla Merino, siempre preocupada por cómo iba el trabajo, por lo que necesitaba. Siempre animando, siempre ayudando. Siempre empujando.

... por el doctor José Díaz, ejemplo de tenacidad, de trabajo.

... por Esther. ¡Perdón!, la doctora Esther Novo. Qué capacidad para ofrecirme ayuda antes de que yo mismo supiese que iba a necesitarla. ¡Qué capacidad de trabajo!, ¡qué futuro le espera en este difícil mundo de la investigación!

... por Jorge. Su facilidad para hacer amigos es infinita. Siempre está ahí, dispuesto a echar una mano. Un "manitas", al que nada se resiste. ¡Qué fácil es crear buen ambiente de trabajo con personas como él!

... por Javi, una buena persona que sabe mucho de informática -y de otras cosas- y con unas enormes ganas de trabajar, o por Javier Beade, compañero de trabajo, al que deseo todo el ánimo del mundo para compaginar docencia e investigación.

... por "mi equipo", Teresa y Anahí. Su interés por el laboratorio y la investigación fue un ejemplo para mí. A veces, el trabajo, el ánimo y la diversión pueden tener las mismas caras. Por Carlos o Rafa. Por Carlos o M^a Jesús. Por Magda o Lucía. Por la doctora Laura Gómez-Ros, colaboradora en la distancia.

... por todos mis ex-compañeros del laboratorio Carmen, Marta, Cristina, Belén, Silvia, Raquel, Claudia, Óscar, Jaime y Estefanía. Los recuerdos comunes son algo inolvidable.

Con todos ellos tengo la sensación de formar parte de un gran equipo y a todos agradezco sus aportaciones, su cariño y su apoyo.

También fundamental ha sido la ayuda prestada por los doctores Javier Cremades, Ignacio Barba y Elvira Sahuquillo, de la Universidade da Coruña; por la doctora M^a Isabel Romero Buján, de la Universidad de Santiago, y por el doctor Alonso Rodríguez y su equipo, de la Universidad Politécnica de Madrid. Su aportación fue fundamental para la localización, identificación y obtención de algunas de las especies estudiadas. Mi agradecimiento también al doctor Enrique Torres, de la Universidade da Coruña, por su colaboración en la obtención de alguna de las imágenes que aparecen en este trabajo, a Paula, por su trabajo con el nitrobenzeno y a Gerardo y Verónica, de la Unidad de Cromatografía de Servicios de Apoyo a la Investigación, por los análisis de tioacidólisis.

No menos importante ha sido el apoyo recibido de mis amigos.

Nieves, Agustín, Pilar, Antonio, Minucha, Xosé Lois, Cristina y Xesús. Rafa, Pilar, Conchi, Javier, Manoli, Jose, Luchi y Antonio. Siempre están ahí. Con eso es más que suficiente.

Jesús y Marisol. Cuantas películas y cuantas conversaciones.

Adán. ¡Que gran tío!

Sina, por su apoyo a la menor oportunidad. Patricia, por sus ánimos y colaboración... y Lucía.

¿Y mi familia? Siempre apoyando. Siempre preguntando y animando. Siempre colaborando. Siempre perdonando el tiempo que les debiera haber dedicado. Sin ellos, sin su valoración de mi trabajo, no me habría atrevido. No se trata de darles las gracias, sí de que sepan lo mucho que los quiero. Gracias José, Manuel, Silvia y Judith. Gracias al, o la, que venga. A mi madre, que siempre confió en mí.

¿Y Fina? Mi compañera. Nada hubiese sido posible sin ella. De colaboradora de muestreos a confidente de resultados. Siempre positiva, sin importar horarios. Siempre ahí. Siempre haciéndome saber que puedo contar con ella. Siempre mostrándome su cariño.

Por eso, y por todo, quiero dedicarte esta tesis.

Para ti, Fina

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	15
I. LA PARED CELULAR VEGETAL	17
I.1. Las proteínas de la pared celular	19
II. LIGNINAS	20
II.1. Naturaleza, composición y localización de las ligninas	23
II.2. Métodos de estudio de las ligninas	25
II.3. Diferencias entre las ligninas de gimnospermas y angiospermas.....	28
III. <i>Zinnia elegans</i> COMO SISTEMA MODELO DE LA LIGNIFICACIÓN	30
III.1. Etapas de la diferenciación del xilema	32
III.2. Hormonas en la diferenciación de traqueidas	33
III.3. Formación de la pared secundaria	34
III.4. Muerte celular programada	35
IV. LIGNIFICACIÓN DE LA PARED CELULAR	36
IV.1. Ligninas en <i>Zinnia elegans</i>	36
IV.2. Biosíntesis de ligninas	37
IV.2.1. Regulación transcripcional de la lignificación.....	40
IV.2.2. La etapa de polimerización	42
IV.2.3. Restricciones impuestas por el mecanismo de polimerización.....	44
IV.2.4. Restricciones impuestas por la heterogeneidad de los monómeros.....	45
V. LAS PEROXIDASAS VEGETALES	47
V.1. Naturaleza y estructura	48
V.2. Polimorfismo	51
V.3. Localización tisular y subcelular	51
V.4. Especificidad de sustrato	52
V.5. Papel fisiológico en la lignificación.....	53
V.6. La peroxidasa básica de <i>Zinnia elegans</i>	54
VI. LIGNINAS Y EVOLUCIÓN.....	55
VI.1. Evolución de los tejidos vasculares y de sostén de las plantas.....	55
VI.2. Las ligninas en las plantas actuales	62
VII. PEROXIDASAS Y EVOLUCIÓN.....	66
VII.1. Filogenia de las peroxidasas	66
VII.2. Las peroxidasas en las plantas actuales	70
OBJETIVOS.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
I. MATERIAL VEGETAL.....	79
I.1. Algas	80
I.2. Plantas terrestres basales (hepáticas y musgos).....	80
I.3. Traqueofitos (plantas vasculares)	81
I.3.1. Licófitos	81
I.3.2. Eufilófitos	82
I.3.2.1. Monilófitos.....	83
I.3.2.1.1 Esfenófitos	83
I.3.2.1.2. Filicófitos (helechos verdaderos)	83
I.3.2.2. Angiospermas	84
I.4. Condiciones de muestreo y crecimiento.....	85

II. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS.....	88
II.1. Localización histoquímica de la actividad peroxidasa	88
II.2. Localización histoquímica de las ligninas. Test de Wiesner	88
III. ESTUDIO DE LAS LIGNINAS	88
III.1. Aislamiento de paredes celulares.....	88
III.2. Cuantificación de ligninas	89
III.3. Oxidación con nitrobenzono	89
III.4. Tioacidolisis	90
IV. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA	91
IV.1. Obtención de la actividad peroxidasa presente en el apoplasto	91
IV.2. Obtención de la actividad peroxidasa total.....	91
IV.3. Medidas de la actividad peroxidasa	91
V. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS	92
V.1. Isoelectroenfoque en equilibrio en placa.....	92
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
I. LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA Y DE LAS LIGNINAS	95
I.1. Estudio histoquímico de la actividad peroxidasa	95
I.2. Localización histoquímica de ligninas.....	97
II. ESTUDIO DE LA LIGNIFICACIÓN.....	102
II.1. Cuantificación de ligninas	102
II.2. Caracterización de ligninas mediante tioacidolisis y oxidación con nitrobenzono: Monómeros estructurales y grado de polimerización.....	103
II.2.1. Comparación entre especies	142
II.3. Caracterización de ligninas mediante tioacidolisis y oxidación con nitrobenzono: Relaciones H/G/S.....	146
II.4. Caracterización de las ligninas: aproximación al grado de polimerización.....	148
II.5. La proporción entre monómeros $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal y la composición monomérica	150
III. ESTUDIO DE LA ENZIMA PEROXIDASA	152
III.1. La actividad peroxidasa	152
III.2. Patrón isoenzimático de peroxidasas	155
IV. VALORACIÓN INTEGRADA DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA Y LA LIGNIFICACIÓN	159
V. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DESDE EL PUNTO DE VISTA FILOGENÉTICO	163
CONCLUSIONES.....	167
BIBLIOGRAFÍA.....	171

INTRODUCCIÓN

I. La pared celular vegetal

Las células vegetales presentan, externamente a la membrana plasmática, una pared celular muy gruesa compuesta básicamente de celulosa, aunque pueden formar parte otras sustancias, como hemicelulosa, pectinas, proteínas, ligninas, cutina, suberina, sales minerales, etc. (Paniagua y cols. 1997). La pared celular de las plantas representa, aproximadamente, la mitad del carbono orgánico de la biosfera. Muchos organismos son capaces de degradar la pared celular y usar los subproductos de esta degradación para su nutrición (Hazlewood y Gilbert 1998). La pared celular es una estructura dinámica, que no sólo es esencial para el mantenimiento de la forma y la rigidez, sino que también juega un papel muy importante en varias funciones fisiológicas tales como el crecimiento, la comunicación intercelular, la defensa contra el ataque de patógenos, la resistencia mecánica y la interacción con el medio ambiente (Cosgrove 1997, Fry 1995).

Los polisacáridos de la pared celular vegetal son los compuestos más abundantes encontrados en la naturaleza, constituyen alrededor de un 90 % de la pared celular vegetal, y se dividen en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectinas. Su composición varía de una especie a otra (dicotiledóneas / monocotiledóneas), pero también en diferentes tejidos de la misma planta (Cosgrove 1997, Heredia y cols. 1995, Popper y Fry 2003).

Las proteínas estructurales y las enzimas constituyen el 10% restante de la pared celular vegetal y juegan un papel crucial en la estructura y en la arquitectura de la pared celular, el metabolismo celular, la elongación celular, la señalización, la respuesta al estrés biótico y abiótico, y en muchos otros procesos fisiológicos (Cosgrove 1997, Fry 1995, Carpita y Gibeaut 1993, Carpita 1996).

La pared celular comprende varias capas que van desarrollándose conforme madura la célula vegetal (Figura 1.1). Mencionadas de fuera hacia dentro de la célula, estas son: lámina media, pared celular primaria y pared celular secundaria.

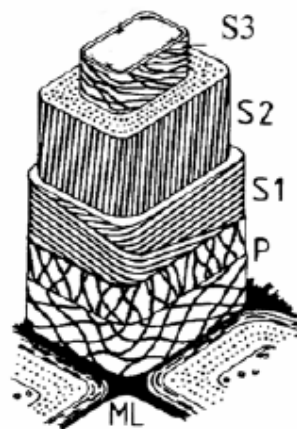


Figura 1.1. Dibujo esquemático de la pared celular vegetal donde se muestra la lámina media (LM), la pared primaria (P) y las distintas capas de la pared secundaria (S_1 , S_2 y S_3). Tomado de Christiernin 2005.

Lámina media

La lámina media es la capa más externa. En la mayoría de los tejidos vegetales, la lámina media es compartida por las células adyacentes. Está constituida por pectinas y proteínas, aunque también se incluyen arabinanos, galactanos, arabinogalactanos y rhamnogalacturonato (Paniagua y cols. 1997).

Pared Celular Primaria

Las células vegetales presentan dos tipos de paredes celulares: la pared celular primaria y la secundaria. La pared celular primaria se sintetiza durante el crecimiento y la elongación celular en los primeros estados del desarrollo, y está compuesta de celulosa, hemicelulosa, polisacáridos pécticos y muchas proteínas, entre ellas la extensina que puede llegar a constituir el 10%, y que es rica en hidroxiprolina y serina. Las microfibrillas de celulosa se encuentran entrecruzadas, lo que facilita el crecimiento y la extensión de la pared primaria. Existen dos tipos de pared celular primaria según la composición de sus polisacáridos. La de tipo I es la más común, mientras que la de tipo II es la típica de las gramíneas (Carpita 1996). Los polímeros no celulósicos de las paredes de tipo I son los xiloglucanos y, constituyendo alrededor del 35 % de la masa de la pared, las pectinas. Las paredes de tipo I se encuentran en todas las dicotiledóneas, en las monocotiledóneas no gramíneas y en las gimnospermas (Carpita y Gibeau 1993). Las paredes de tipo II tienen un contenido bajo en pectina y en xiloglucano, y alto en arabinoxilano (Carpita 1996). Las paredes de tipo II también contienen mezclas de β -D-glucanos, y poseen puentes de ferúlico que entre-cruzan las cadenas de xilano, y que no están presentes en las paredes celulares de tipo I.

Pared Celular Secundaria

La pared celular secundaria se sintetiza al final del desarrollo y se deposita en células especializadas como los vasos y traqueidas (componentes del xilema), las escleréidas y fibras (componentes del esclerénquima). En comparación con las paredes primarias, las paredes secundarias contienen más celulosa, lo que les confiere una mayor cristalinidad, por lo que son más deseadas en la industria maderera (Minic y Jouanin 2006). Además de la celulosa, la pared secundaria suele contener otras sustancias como las ligninas en los vasos, las traqueidas y el esclerénquima; la suberina en la capa del súber de la corteza y las sales minerales (principalmente carbonatos y sílice) (Paniagua y cols. 1997). La pared celular secundaria comprende tres subcapas: S_1 , S_2 y S_3 , mencionadas de fuera hacia dentro. Estas subcapas son birrefringentes, pues a diferencia de lo que ocurre en la pared primaria, en cada una de ellas las microfibrillas de celulosa se disponen de una forma ordenada en varios planos de modo que, en cada plano, todas las microfibrillas son paralelas, cambiando la orientación de las fibrillas de un plano al siguiente (Paniagua y cols. 1997).

1.1. Las proteínas de la pared celular

Las paredes celulares vegetales son estructuras complejas compuestas de polisacáridos y proteínas (Tabla 1.1). Los modelos actuales describen la disposición de sus componentes en dos redes estructuralmente independientes que interactúan y que están embebidas en una matriz de pectina (Carpita y Gibeaut 1993, Cosgrove 2000). Las microfibrillas de la celulosa y la hemicelulosa constituyen la red primaria y las proteínas estructurales forman la red secundaria. Según Jamet y cols. (2006), se consideran proteínas de la pared celular todas aquellas secretadas al espacio extracelular, así como a las proteínas localizadas entre la membrana plasmática y la pared celular. Podemos distinguir tres tipos de proteínas de la pared celular de acuerdo a sus interacciones con los otros componentes de la misma:

1- Proteínas con poca o ninguna interacción con otros componentes de la pared celular, que se mueven libremente en el espacio extracelular. Estas proteínas son mayoritarias en el medio de cultivo líquido de suspensiones celulares y pueden ser extraídas con tampones de baja fuerza iónica. A esta fracción se le denomina “proteínas solubles”, y la mayoría de ellas tienen un punto isoelectrico (pI) ácido, entre 2 y 6.

2- Proteínas unidas débilmente a la matriz por fuerzas de Van Der Waals, por puentes de hidrógeno o por interacciones hidrofóbicas o iónicas. Estas proteínas se pueden extraer mediante sales, y la mayoría de ellas tienen un punto isoelectrico básico, entre 8 y 11, de manera que están cargadas positivamente al pH ácido de las paredes celulares. Aunque la mayoría de los polisacáridos de la pared celular son neutros, las pectinas están cargadas negativamente debido a los ácidos poligalacturónicos, y estas cargas negativas favorecen las interacciones con las proteínas de alto pI. Tales interacciones son moduladas por el pH, el grado de interacción de las pectinas, la concentración de calcio, y los coeficientes de movilidad y difusión de estas macromoléculas (Varner y Lin 1989).

3- Proteínas unidas covalentemente a otros componentes de la pared celular, que no pueden extraerse con sales. Este es el caso de las extensinas que están unidas mediante enlaces covalentes (Brady y cols. 1996, Schnabelrauch y cols. 1996).

Las proteínas de la pared celular se encuentran embebidas en una matriz polisacáridica insoluble e interactúan con otros componentes de la pared celular haciendo de su extracción un desafío. Los proteomas disponibles de la pared celular incluyen, fundamentalmente, proteínas unidas mediante enlaces débiles. Las proteínas unidas mediante enlaces débiles son extraídas de las paredes celulares con agentes quelantes o con sales. Estas proteínas se pueden perder durante la preparación de las paredes celulares y, además, deben ser extraídas de los tejidos por técnicas no destructivas como la infiltración a vacío (Boudart y cols. 2005) o recuperadas del medio de cultivo de una suspensión celular simplemente por centrifugación (Borderies y cols. 2003, Charmont y cols. 2005). Hasta ahora no existe ningún procedimiento eficiente que permita extraer las proteínas de la pared celular unidas covalentemente a

la matriz extracelular. Las proteínas estructurales, como las extensinas, o las proteínas ricas en hidroxiprolina, se pueden unir mediante puentes isoditrosina (Brady y cols. 1996, Held y cols. 2004). Otra dificultad es la separación de los polipéptidos mediante electroforesis bidimensional. La mayoría de las proteínas de la pared celular son glicoproteínas básicas y son difíciles de separar con esta técnica (Rabilloud 2002). Más del 60% de las proteínas de la pared celular tienen un punto isoeléctrico entre 8,0 y 12,9 con una media de 8,5. Estas proteínas de pared incluyen sólo unas pocas proteínas estructurales, bien conocidas por su punto isoeléctrico básico. Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (GPRH) se encuentran muy glicosiladas, son difíciles de detectar en los geles y son resistentes a proteasas. Tales proteínas requieren el desarrollo de métodos específicos de aislamiento y desglicosilación, como los utilizados para las extensinas y las proteínas arabinogalactano (PAG) (Schultz y cols. 2004).

Tabla 1.1. Clases funcionales de proteínas unidas a la pared celular mediante enlaces débiles. Las proteínas se agrupan en clases y subclases de acuerdo a su función biológica. Datos correspondientes a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Tomados de Jamet y cols. 2006.

Clases funcionales	Porcentaje de proteínas identificadas en <i>Arabidopsis</i>
Proteínas que actúan sobre los polisacáridos	29,5 %
Glicósido hidrolasas	21 %
Esterasas y liasas	5,5 %
Expansinas	3,0 %
Oxido-reductasas	13,5 %
Peroxidasas	6,0 %
Proteínas estructurales	1,5 %
Proteínas implicadas en la señalización	8,0 %
Proteasas	10,0 %
Proteínas que interaccionan con dominios	10,0 %
Tipo lectina	2,5 %
Tipo LRR	3,5 %
Inhibidores de enzimas	3,0 %
Otras	16,5 %
Proteínas con función desconocida	10,0 %

II. Ligninas

El xilema constituye una vía de baja resistencia para el transporte del agua en plantas vasculares. Este sistema transporta el agua eficazmente desde los lugares de absorción en la raíz hasta las superficies de evaporación en las hojas. La mayoría de las células terminales diferenciadas realizan funciones especializadas antes de morir pero, en el caso del xilema, la adquisición de la función implica la muerte celular. Así,

las células conductoras no tienen membranas ni orgánulos, y lo que permanece son las paredes celulares engrosadas y lignificadas (Figura 1.2), que forman tubos huecos a través de los cuales el agua puede fluir con una resistencia relativamente baja (Kozela y Regan 2003).

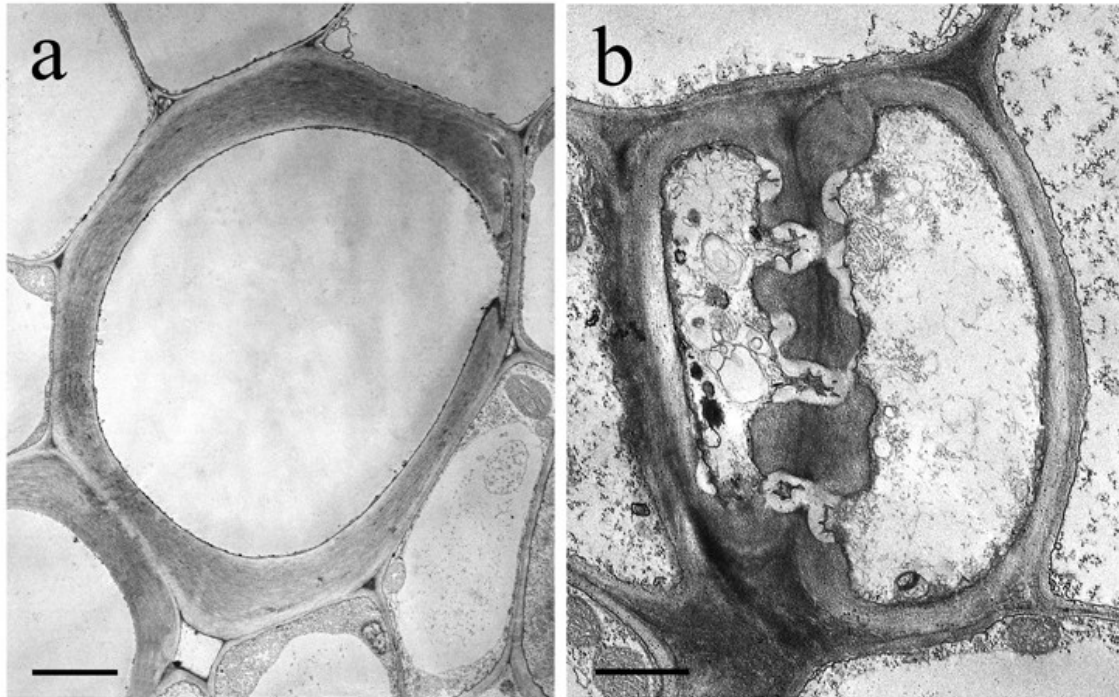


Figura 1.2. Imágenes de microscopio electrónico de un vaso del xilema de *Z. elegans* que ha perdido el citoplasma y en la que se aprecia las paredes celulares secundarias (a), y de un tubo criboso de la misma planta (b). Barras = 3 μm (en a) y 1 μm (en b).

Los elementos diferenciados del xilema (células conductoras de agua) se encuentran revestidos internamente de ligninas (del latín *lignum*: leño) (Figura 1.3), que son heteropolímeros fenólicos tridimensionales covalentemente asociados a la matriz polisacáridica de las paredes celulares (Anterola y Lewis 2002). Las ligninas también se encuentran en otros tejidos de sostén, tales como las fibras del floema y del xilema, y son el resultado de la polimerización oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos, en una reacción mediada por lacasas (Liu y cols. 1994) y peroxidasas (Ros Barceló 1997), que da lugar a un heteropolímero hidrofóbico ópticamente inactivo (Ralph y cols. 1999a). Este proceso de sellado de las paredes celulares vegetales a través de la deposición de lignina, conocido como lignificación, proporciona fuerza mecánica a los tallos y protege a las fibras de celulosa de la degradación mecánica y biológica (Grabber y cols. 1998). En este contexto, la degradación de la pared celular vegetal es uno de los principales factores restrictivos en el uso y reciclaje de la biomasa vegetal (Anterola y Lewis 2002).

Las ligninas representan el compuesto orgánico más abundante sobre la superficie de la tierra después de la celulosa, y constituye alrededor del 25% de la biomasa vegetal (Higuchi 1990). Se encuentran principalmente en plantas vasculares

(tracheophyta), y se localizan selectivamente en las paredes celulares secundarias de determinadas células, las cuales, forman parte de tejidos leñosos, no sólo en los vasos del xilema y las traqueidas, sino también en las fibras y las esclereidas (Ros Barceló 1997). Las ligninas se han identificado en pteridofitas (helechos, licófitos, equisetos), ampliamente consideradas como las primeras plantas vasculares, y es posible que las ligninas hayan jugado un papel clave en la colonización del paisaje terrestre por las plantas durante la transición del Ordovícico al Silúrico, hace de 400 a 450 millones de años (Niklas 1997). Así, desde el punto de vista botánico, el fenómeno de la lignificación está asociado con la adquisición de la estructura vascular en las plantas.

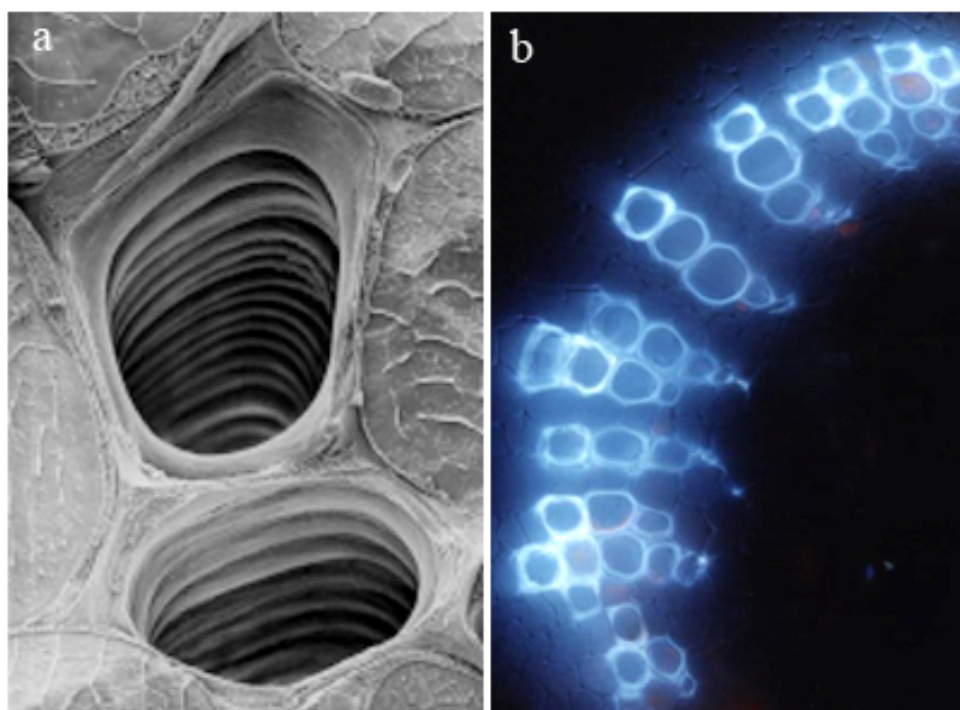


Figura 1.3. Microfotografía electrónica de barrido del xilema de *Zinnia elegans* L., cortesía de Kim Findlay (Roberts y McCann 2000) (a). Autofluorescencia azul de las ligninas en los tejidos vasculares de *Catharanthus roseus* (L.) Don tras iluminar con luz UV de 340 nm, cortesía de M. Sotomayor (IBMC, Universidad de Porto) (b).

Las ligninas presentan también una gran importancia desde un punto de vista económico, ya que la fuerte lignificación que experimenta la madera dificulta y encarece las labores de la industria papelera, aumentando el nivel de los residuos tóxicos indeseables. La lignificación también disminuye la calidad nutritiva de las plantas utilizadas como forrajes y pastos al reducir su digestibilidad y, por lo tanto, su utilidad como alimentos. Por último, la lignificación se destaca como factor indeseable durante el procesamiento de ciertas hortalizas en las industrias agroalimentarias ya que les confiere una dureza desagradable a los productos manufacturados.

Los usos industriales de las ligninas son muchos y variados, aumentando su importancia día a día. Las ligninas se emplean como aglutinantes, como rellenos y como extendedores. Otros usos, que se basan en la naturaleza de las ligninas, son su

conversión en vanillina, en materiales curtientes y en dispersantes para reforzar materiales de relleno para caucho.

Derivados de la lignina, obtenidos como residuos en la fabricación de papel, son empleados también como humedecedores y dispersantes de mezclas acuosas de pigmentos. Tal es el caso de los sulfonatos, utilizados en las industrias cerámicas y del caucho, o las ligninas al sulfito, empleadas -entre otros usos- como aglomerantes en los caminos.

II.1. Naturaleza, composición y localización de las ligninas

Las ligninas son heteropolímeros fenólicos y amorfos que resultan del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos (Figura 1.4) el alcohol *p*-cumarílico (4-hidroxicinámico) (I), el alcohol coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinámico) (II) y el alcohol sinapílico (3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) (III), en una reacción mediada por las peroxidasa (Boudet y cols. 1995, Ros Barceló 1997). Esta reacción produce un heteropolímero hidrofóbico, ópticamente inactivo (Ralph y cols. 1999a), compuesto por unidades 4-hidroxifenilo (H, *p*-hidroxifenilo), unidades 4-hidroxi-3-metoxifenilo (G, guaiacilo) y unidades 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenilo (S, siringilo), respectivamente. El hecho de que los tres constituyentes monoméricos de las ligninas difieran en el grado de metoxilación (Figura 1.4), y de que para cada uno de los tres bloques de construcción, el radical tenga al menos, cinco formas mesoméricas (Figura 1.4) sugiere que se pueden formar una gran cantidad de subestructuras durante la dimerización (Ros Barceló y cols. 2004), $C_{m,n} = m(m+1) / n(n-1) = 120$, donde m es el número de formas mesoméricas que son combinadas ($m = 3 \times 5 = 15$) y n el grado de polimerización ($n = 2$).

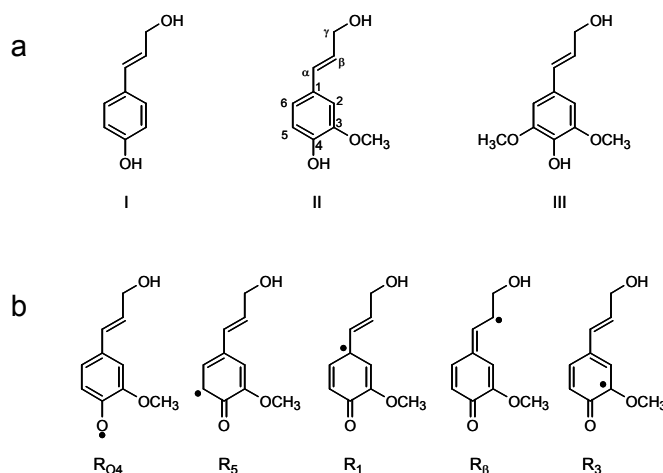


Figura 1.4. Estructuras de los alcoholes *p*-cumarílico (I), coniferílico (II) y sinapílico (III) (a). Principales formas mesoméricas de los radicales del alcohol coniferílico formados durante la oxidación del alcohol coniferílico por la peroxidasa (b). Tomado de Ros Barceló y cols. 2004.

En las ligninas, las unidades fenilpropanoide están interconectadas mediante uniones éter y carbono-carbono (Ralph y cols. 2004b), que conducen a las principales subestructuras: aril-glicerol- β -aril éter, fenilcumarano, diarilpropano, resinol, bifenilo y éter difenilo, así como a otras de menor importancia (Figura 1.5). Los enlaces más frecuentes, β -O-4, se presentan en las subestructuras aril-glicerol- β -aril éter, que son las dianas de la mayoría de los procesos de despolimerización de las ligninas, incluyendo la tioacidólisis. Sin embargo, otros enlaces entre unidades tales como los β -5 (en las subestructuras fenilcumarano), los β -1 (en las subestructuras diarilpropano), los β - β (en las subestructuras resinol), los 5-5 (en las subestructuras bifenilo) y los 5-O-4 (en los éteres difenilo), son muy resistentes a la degradación. Por lo tanto, desde el punto de vista químico, las ligninas son polímeros poco definidos cuya composición monomérica varía enormemente, como lo hace la naturaleza de sus enlaces entre unidades. Por ello, la expresión “ligninas” es preferible al uso de “lignina” ya que, probablemente, existe una gran diversidad de estructuras químicas dentro de las ligninas naturales (Boudet 1998). Este elevado grado de variabilidad estructural depende no sólo del tipo de especie y de tejido sino también del tipo de célula.

En cuanto a su localización, las ligninas se encuentran presentes en grandes cantidades en las paredes celulares secundarias de todas las plantas vasculares verdaderas, los helechos y, probablemente, en los musgos aunque en este último caso no pueda afirmarse con rotundidad. No obstante, las ligninas están ausentes en los musgos carentes de traqueidas y en las algas (Lewis y Yamamoto 1990).

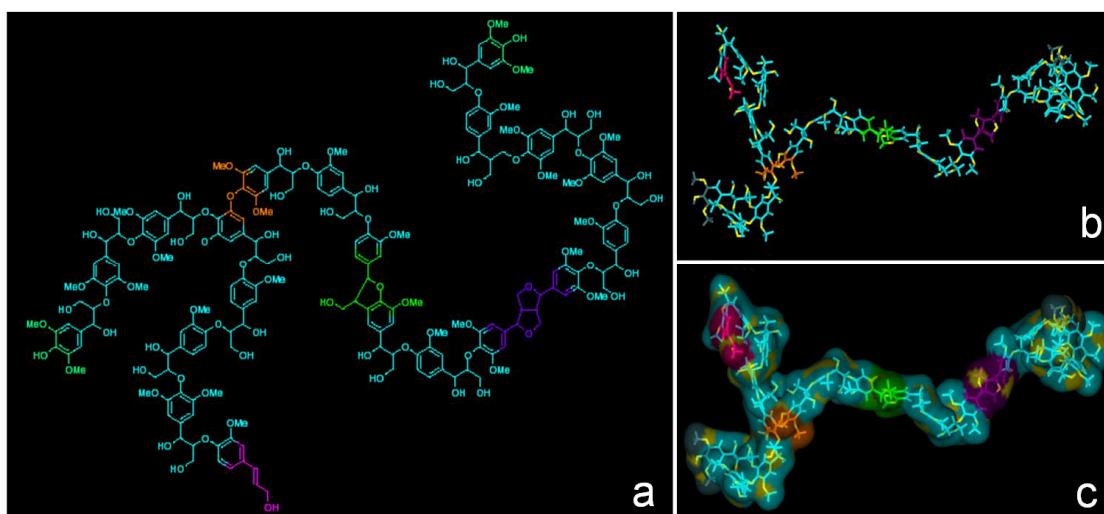


Figura 1.5. Estructura extendida de las ligninas de álamo mostrando los diferentes tipos de enlaces (a) y su configuración tridimensional (b y c). Cortesía de John Ralph (Universidad USDA, Madison, Wisconsin).

Las ligninas se depositan mayoritariamente en las paredes celulares de un número limitado de tipos de células como son las traqueidas, los vasos, las fibras del xilema y del floema y las esclereidas. La naturaleza de las ligninas varía según el tipo de célula. Este hecho se observa de forma clara en el xilema de *Arabidopsis thaliana*, en el que predominan las ligninas de tipo G, mientras que en las células altamente

lignificadas y adyacentes del esclerénquima existen fundamentalmente ligninas de tipo S (Chapple y cols. 1992).

De forma análoga, pueden apreciarse variaciones en la naturaleza de las ligninas encontradas dentro de una misma pared celular, siendo esta heterogeneidad observada durante la deposición de ligninas en la pared celular secundaria, apareciendo diferencias tanto en el contenido como en la composición monomérica media. En cuanto a variaciones en el contenido, Donalson (1985) encontró que la concentración de ligninas era del 16-27% en la pared celular secundaria, mientras que en la lámina media de coníferas era más elevada, del orden del 38-88%. En lo referente a la composición monomérica, las ligninas depositadas en la lámina media y esquinas celulares son ricas en unidades H, predominando las unidades de tipo G en los engrosamientos secundarios (Terashima y Fukushima 1989).

II.2. Métodos de estudio de las ligninas

Existen innumerables métodos para el estudio de las ligninas, unos orientados a detectar su presencia, o determinar su localización, y otros a determinarlas cuantitativamente, o bien a estudiar en profundidad su estructura y composición.

Pruebas histoquímicas y citoquímicas para la detección de las ligninas

Debido al número extraordinariamente elevado de grupos funcionales que presentan, las ligninas son capaces de reaccionar con diversos reactivos químicos para dar lugar a un amplio espectro de reacciones de color, que han sido utilizadas en su detección cito e histoquímica. Así, entre los test histoquímicos más comúnmente utilizados, cabe destacar la reacción con azul de toluidina, el test de Wiesner (específico para grupos cinamaldehído) y la reacción de Mäule (específica para grupos siringilo) (Strivastava 1966). La especificidad de estos ensayos provoca que algunas veces no se hayan observado tinciones positivas en plantas de las que se sabe que contienen ligninas (por ejemplo, con ligninas siringilo, usando el test de Wiesner) (Sarkanen y Ludwig 1971). Una característica de las ligninas es su autofluorescencia azul cuando se iluminan con luz de 330-380 nm. Todas estas características han sido utilizadas para poder detectar y estudiar la presencia de ligninas en los distintos tejidos vegetales.

Métodos degradativos y analíticos en el estudio de las ligninas

Probablemente, uno de los métodos más usados sea la extracción con bromuro de acetilo, desarrollado por Johnson y cols. (1961), que permite la detección de ligninas en pequeñas muestras de paredes (3-6 mg) de forma rápida y fácil en base a la absorbancia a 280 nm. Sin embargo, este método presenta algunos problemas como es el hecho de que el bromuro de acetilo degrada los xilanos, polisacáridos muy abundantes en todas las plantas lignificadas, produciendo un aumento de la absorbancia en la región entre 270-280 nm, zona en la que se cuantifican las ligninas, lo que provoca que la cantidad de ligninas presentes en la muestra sea sobrevalorada

(Hatfield y cols. 1999). Esta sobrevaloración puede evitarse bajando la temperatura de reacción a 50 °C y aumentando su duración de 2 a 4 horas, pequeños cambios que reducen la degradación de los xilanos, y la consecuente interferencia en la cuantificación de las ligninas (Hatfield y cols. 1999). A pesar de este problema, el método resulta bastante adecuado para el estudio rutinario de pequeñas muestras debido a su rapidez y sencillez.

Como ya se mencionó anteriormente, en la estructura de las ligninas existen una serie de enlaces que unen las diferentes subunidades. Entre ellos, los enlaces β -O-4 son muy numerosos y bastante lábiles, por lo que son el objetivo de muchos de los procesos de despolimerización. Sin embargo, los enlaces carbono-carbono son muy resistentes, especialmente los enlaces 5-5 bifenilo, que son propios de los dímeros de las subunidades guaiacilo, lo que explica que las maderas de las coníferas, ricas en unidades guaiacilo, sean difícilmente despolimerizadas (Adler 1977). Así mismo, otros enlaces como los β -5, β -1, β - β o 4-O-5 son también muy resistentes a la degradación.

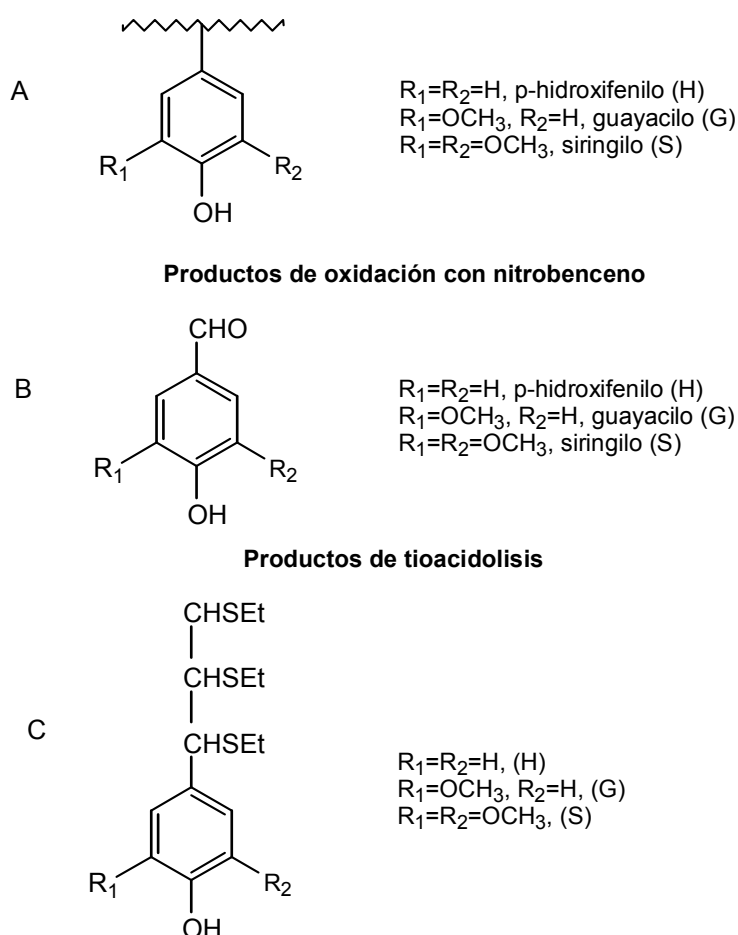


Figura 1.6. Unidades estructurales de las ligninas (A), productos de degradación con nitrobenzeno (B) y productos de tioacidolisis (C).

La conversión de los polímeros de lignina en fenoles de bajo peso molecular, por métodos degradativos, permite un método analítico de estudio de la composición de las ligninas y nos aporta información sobre la estructura de los polímeros originarios.

Estos procesos degradativos, sin embargo, se desarrollan con bajo rendimiento debido, sobre todo, a la existencia de enlaces muy fuertes. En este punto, las ligninas se diferencian de otros biopolímeros como las proteínas, los polisacáridos o los ácidos nucleicos, los cuales contienen uniones lábiles, susceptibles de romperse bien química o enzimáticamente por la acción de hidrolasas.

Aunque los métodos degradativos han sido muy criticados por sus bajas eficacias, y por la formación potencial de artefactos, las descripciones más completas de los tipos y de los patrones de unión dentro de las ligninas se han conseguido gracias a procesos como la tioacidolisis, la acidolisis, la oxidación con permanganato o la hidrogenolisis (Lapierre y cols. 1995).

Probablemente los métodos degradativos más usados sean los de la oxidación con nitrobenzenu y óxido cúprico en medio alcalino. La oxidación con nitrobenzenu es bastante efectiva, pero todas las oxidaciones alcalinas tienen el problema de acortar las cadenas laterales de las ligninas, y no proporcionan información sobre sus grupos funcionales, ni sobre el tipo de enlace entre subunidades (Figura 1.6). Además, con muestras suberizadas, existe un alto riesgo de interferencia entre las ligninas y otros fenoles de la pared que derivan en productos similares. El contenido en grupos siringilo puede estar sobrevalorado (Manders 1987).

El método de la acidolisis preserva los esqueletos C_6C_3 aportando mayor cantidad de información y menos interferencias; sin embargo, el rendimiento es relativamente bajo debido a reacciones colaterales. Estos problemas se solventan en la tioacidolisis, en la cual, se reemplaza el agua usada en la acidolisis por el etanotiol, y el HCl por el BF_3 .

La tioacidolisis es una despolimerización ácida, que actúa mediante la escisión de los enlaces β -O-4. El método combina la acción de un ácido fuerte, el BF_3 , y un nucleófilo, EtSH. Sólo las unidades unidas por enlaces arilglicerol- β -aril éter proporcionan monómeros fenilpropano C_6C_3 con las cadenas laterales tioetiladas. Como la tioacidolisis degrada las ligninas a estructuras que mantienen las características de las cadenas originales (Figura 1.6), la determinación de los monómeros obtenidos, y sus cantidades, permite obtener gran cantidad de información sobre los grupos funcionales y la estructura de las ligninas. Los grupos benzaldehído, cinamalaldehído y alcoholes cinamílicos implicados en los enlaces β -O-4 pueden ser estimados a partir de sus productos específicos de degradación. La tioacidolisis permite además acoplar reacciones complementarias como la per-metilación de las ligninas con CH_3N_2 , que permitiría detectar grupos terminales libres, guaiacilo o siringilo, aportando una información importantísima sobre la arquitectura de la lignina. Así mismo, la desulfuración de las muestras una vez tioacidolizadas permite el análisis de los dímeros. Sin duda, la limitación más importante de la tioacidolisis es su aplicación a ligninas con una proporción baja de enlaces β -O-4, los resultados obtenidos difícilmente pueden ser extrapolables al conjunto del polímero. En estos casos el uso complementario de la oxidación con nitrobenzenu constituye una herramienta muy útil.

II.3. Diferencias entre las ligninas de gimnospermas y angiospermas

La mayor variación en la composición de los monómeros de las ligninas en las plantas vasculares se da entre los dos grupos principales de plantas con semillas. Así, en las gimnospermas, las ligninas están compuestas de unidades G, con una menor proporción de unidades H, mientras que, en las angiospermas, las ligninas están compuestas de una proporción similar de unidades G y S (Higuchi 1990). Esta regla tiene sus excepciones, ya que existen gimnospermas en las que predominan las ligninas de tipo S, y angiospermas en las que las ligninas son principalmente de tipo G (Lewis y Yamamoto 1990). En las monocotiledóneas (Ralph y cols. 2004a), las ligninas son más complejas, ya que contienen cantidades importantes de ácido *p*-cumárico unido por enlaces éter (Ralph y cols. 1994).

El contenido relativo de unidades S/G no es la única diferencia que puede apreciarse entre angiospermas y gimnospermas, ya que también se observan variaciones en la predominancia de los tipos de enlace. En este sentido, Lapierre y cols. (1995) han demostrado mediante la técnica de tioacidolisis que las ligninas de las angiospermas leñosas difieren en la proporción de enlaces β -O-4 de las ligninas presentes en las gimnospermas leñosas y en las herbáceas. Así, aproximadamente el 60-65% de las unidades C₆C₃ en las ligninas de las angiospermas leñosas están unidas por enlaces β -O-4, mientras que este valor se reduce al 30% en el caso de las gimnospermas leñosas, siendo dicho porcentaje aún menor en las herbáceas (Figura 1.8). Por tanto, las ligninas de las gimnospermas leñosas están más ramificadas mediante enlaces carbono-carbono que las ligninas de las angiospermas leñosas.

En el caso de las gramíneas, Ralph y cols. (1994) han detectado cantidades significativas de ácido *p*-cumárico unido por enlaces éter a las ligninas. Billa y cols. (1996) han propuesto la presencia de un núcleo G-S en las ligninas de las herbáceas, similar al encontrado en las ligninas típicas de las angiospermas, y en donde las unidades H (provinientes del ácido *p*-cumárico) forman los puntos de anclaje con los polisacáricos de la pared celular. Así, se puede concluir que la complejidad química de las ligninas ha aumentado durante el curso de la evolución vegetal desde las especies más ancestrales, como las pteridofitas y las gimnospermas, hasta las especies más evolucionadas, como las monocotiledóneas.

También se encuentran diferencias en la función realizada por las células del xilema. Así, en gimnospermas, las traqueidas del xilema participan tanto en el soporte mecánico como en el transporte de agua. En contraste, el xilema secundario de las angiospermas leñosas contiene dos tipos especializados de células: los elementos de los vasos, que conducen el agua, y las fibras, que proporcionan soporte estructural. Esta segregación de la función en el xilema de las angiospermas produce una mayor eficiencia y economía. Esta eficiencia se muestra evidente en los pocos pero grandes elementos de los vasos, que muestran un contenido de lignina reducido (20% de materia seca) comparado con el de las gimnospermas (30% de materia seca) (Figura 1.7). Un bajo contenido en lignina y alto en carbohidratos requiere significativamente menos energía, ya que se consume menos carbono en los sumideros vegetales

(Amthor 2003). En las angiospermas, las células del xilema primario y los vasos conductores de agua del xilema secundario son ricos en ligninas tipo G, como las traqueidas de las gimnospermas más basales, mientras que las células de las fibras no conductoras del xilema son ricas en unidades S (Peter y Neale 2004).

No hay estudios sobre el tipo de lignina que presentan las plantas basales, briófitos y helechos. En general se asume que las ligninas de aquellas en las que se han descubierto son del tipo G, similares a las de gimnospermas.

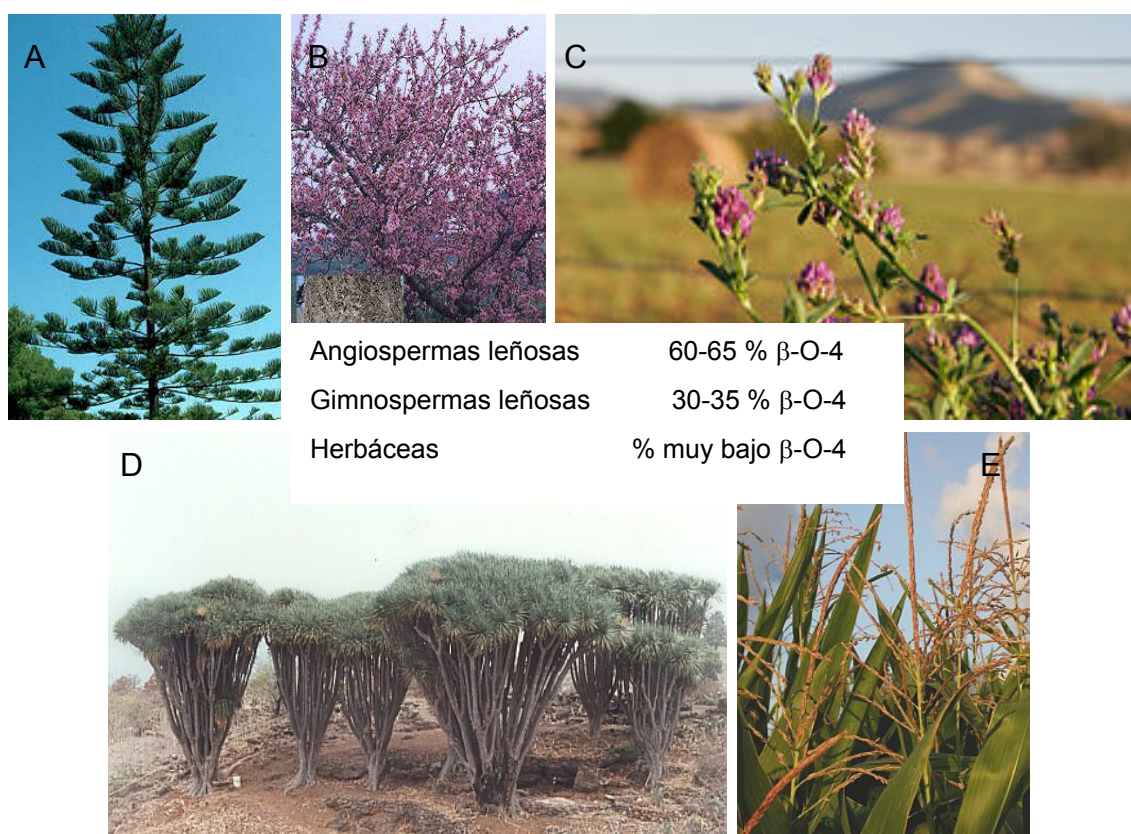


Figura 1.7. Ejemplos de gimnosperma leñosa, *Araucaria heterophylla* (Salisb.) Franco (A); angiosperma dicotiledónea leñosa, *Prunus dulcis* (Mill.) Webb (B); angiosperma dicotiledónea herbácea, *Medicago sativa* L. (C); angiosperma monocotiledónea leñosa, *Dracaena draco* L. (D); y de angiosperma monocotiledónea herbácea (gramínea), *Zea mays* L. (E).

El hecho de que las células conductoras de agua en las plantas con semilla estén compuestas principalmente de ligninas de tipo G, sugiere una fuerte presión selectiva para conservar la ruta de biosíntesis de estas ligninas, y su regulación, en las células conductoras del xilema durante la evolución de las plantas con semilla (Peter y Neale 2004). De hecho, evidencias moleculares sugieren que una ruta ancestral, predominante para la síntesis del alcohol coniferílico, se conservó entre las plantas con semillas, y que una ruta lateral, para la síntesis del alcohol sinapílico, evolucionó más recientemente en angiospermas (Peter y Neale 2004). Esta divergencia, aparentemente, ocurrió en las angiospermas basales, antes de la segregación de las monocotiledóneas de las eudicotiledóneas.

Durante la evolución de las plantas con semilla co-evolucionaron las diferencias en el pool de sustratos para la lignificación, no solo con la segregación de las funciones de transporte de agua y soporte, sino también con la forma/estructura de las células conductoras. El xilema de las gimnospermas está compuesto únicamente de traqueidas con un diámetro menor de 30 μm , mientras que el xilema de las angiospermas está típicamente formado por vasos con grandes lúmenes (entre 100-200 μm de diámetro) (Brodribb y cols. 2005). Debido a que la conductividad hidráulica de los tubos es proporcional a cuatro veces el valor del radio (Sperry y cols. 2005), los vasos de las angiospermas son mejores conductores del agua que el xilema de las gimnospermas, y esto permite a las angiospermas mantener altas capacidades fotosintéticas (Figura 1.8) (Brodribb y cols. 2005). El gran potencial vegetativo y reproductor de las angiospermas conferido por los vasos (Brodribb y cols. 2005) fue, aparentemente, una de las razones de su radiación durante el Cretácico, la cual posiblemente tuvo una mayor influencia en el subsecuente descenso de la diversidad de las gimnospermas. Sin embargo, los grandes vasos también pueden convertirse en una desventaja debido a las frecuentes embolias que se producen durante la congelación/descongelación de los vasos del xilema (Sperry y cols. 2005), y esta es una de las razones por las que las familias de las gimnospermas todavía dominan muchas de las regiones templadas y la mayoría de las boreales, y de por qué el bosque tropical y subtropical es el único en donde las gimnospermas tienden a estar ausentes (Brodribb y cols. 2005).

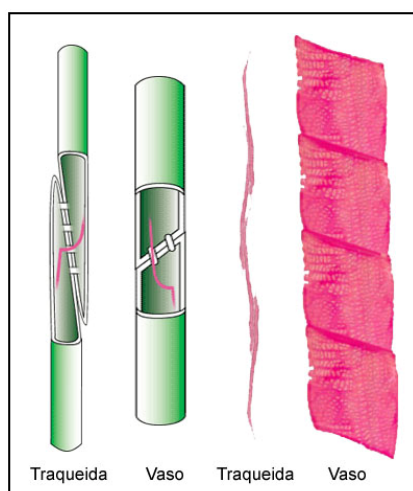


Figura 1.8. El xilema de las gimnospermas está compuesto de traqueidas con un diámetro menor de 30 μm , mientras que el xilema de las angiospermas está típicamente formado por vasos con grandes lúmenes (entre 100-200 μm de diámetro). Los vasos de las angiospermas son más conductores del agua que el xilema de las gimnospermas, y esto permite a las angiospermas mantener altas capacidades fotosintéticas.

III. *Zinnia elegans* como sistema modelo de la lignificación

La formación del xilema ha sido objeto de numerosos estudios en plantas superiores, no sólo porque su función es esencial para la existencia de las plantas vasculares, sino porque la formación del xilema supone un modelo único del proceso de diferenciación en plantas superiores. Además, la xilogénesis es importante desde una perspectiva aplicada y biotecnológica, ya que los biomateriales, como la celulosa y las ligninas, representan una gran parte de la biomasa terrestre, y además juegan un importante papel en el ciclo del carbono (Fukuda 1996).

Las traqueidas son las células más distintivas del xilema y se caracterizan por la presencia de una pared celular secundaria con engrosamientos que pueden ser espirales, anulares, reticulados o con punteaduras (Figura 1.10). En el xilema primario, las traqueidas se diferencian a partir de las células pro-cambiales mientras que en el xilema secundario, derivan de las células del cambium vascular.

La formación de traqueidas se pueden inducir *in vitro* a partir de varios tipos de células, como las del parénquima del floema y del cortex en raíces, del parénquima medular en vástagos, del parénquima en tubérculos, y del mesófilo en hojas (Roberts y cols. 1988, Fukuda 1992).

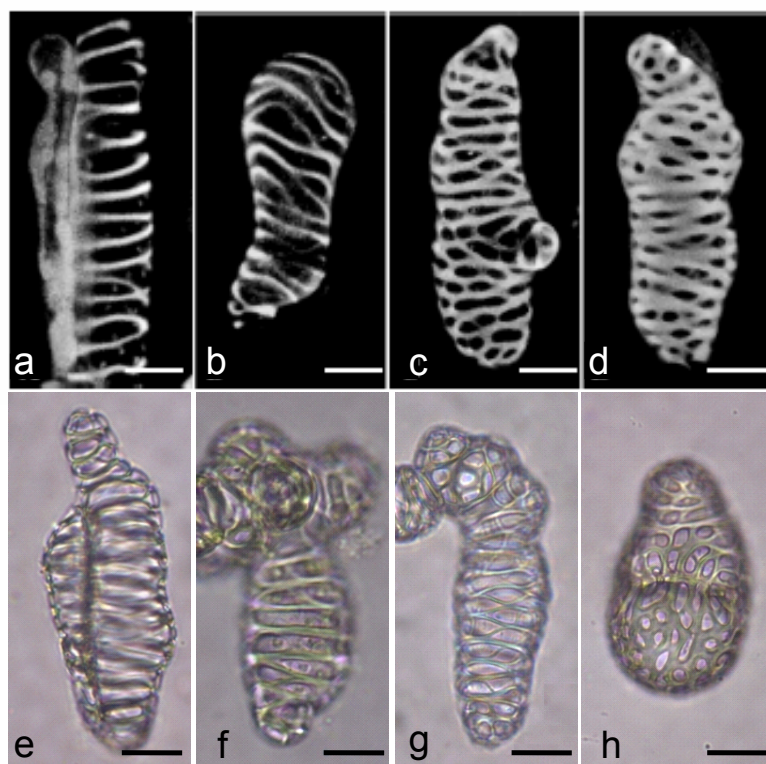


Figura 1.9. Patrones característicos de los engrosamientos de la pared celular secundaria observados con microscopía confocal (a, b, c y d) y con microscopía óptica de campo claro (e, f, g y h). a y e: anular, b y f: espiral, c y g: reticular, d y h: reticular-escalariiforme. Barra = 15 μ m. a, b, c y d: tomado de Pesquet y cols. 2003.

Fukuda y Komamine (1980), basándose en los trabajos de Kohlenbach y Schmidt (1975), establecieron un sistema experimental *in vitro* en el que células aisladas de mesófilo de hojas de *Zinnia elegans* se diferenciaban directamente a traqueidas en un medio de cultivo que contenía auxinas y citoquininas.

En la práctica, este sistema experimental depende de muchos factores, como la edad y las condiciones de la planta de *Z. elegans*, el material de cultivo así como las condiciones específicas del mismo (Fukuda 1992, Roberts y cols. 1992). El modelo de xilogénesis de *Z. elegans* es particularmente útil para el estudio de la secuencia de etapas que ocurren durante la diferenciación a traqueidas, ya que se puede estudiar el proceso en células aisladas. De hecho, la diferenciación es un proceso inducible,

desencadenado por el establecimiento del propio cultivo, y por la adición de auxinas y citoquininas exógenas, en el que las células se diferencian semi-sincrónicamente con una alta frecuencia (McCann y cols. 2000). Además, debido a sus características morfológicas, estas células se pueden identificar con facilidad. Esta propiedad unida al hecho de que la inducción de la diferenciación de traqueidas *in vitro* es un proceso relativamente simple de reproducir, hace que este sistema se utilice en estudios de diferenciación celular (Figura 1.9).

Por otra parte, en el sistema de *Zinnia elegans* se han encontrado numerosos marcadores bioquímicos, citológicos y moleculares característicos. Los estudios moleculares de estos marcadores han proporcionado importantes hitos acerca del mecanismo de diferenciación de las células de mesófilo a traqueidas (Hauffe y cols. 1991, Leyva y cols. 1992, Keller y Baumgartner 1991, Fukuda 2004). Los análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (ADNc-AFLP) permiten descubrir los perfiles de expresión temporal de los genes más relevantes en el proceso de diferenciación (Milioni y cols. 2002). El análisis de micromatrices con el sistema de *Z. elegans* ha reflejado un perfil de expresión de 9000 genes que cambian durante la diferenciación de las células del xilema (Demura y cols. 2002). Además, se ha demostrado que la expresión de algunos de estos marcadores está estrechamente asociada con el desarrollo del xilema tanto *in vivo* como *in vitro*. De esta manera, el sistema celular de *Z. elegans* ha contribuido enormemente a la comprensión de la xilogénesis (Sugiyama y Fukuda 1995).

III.1. Etapas de la diferenciación del xilema

El sistema experimental de *Z. elegans* ha sido muy útil para la elucidación de las diferentes etapas implicadas en la diferenciación de traqueidas (Roberts y cols. 1988, Sugiyama y Komamine 1990, Chasan 1994, Fukuda 1992, 1994). El proceso de diferenciación de las células del xilema (Figura 1.10) se divide en tres etapas (Fukuda 1996, 1997):

- Estado I: Se produce la inducción de la desdiferenciación como consecuencia del establecimiento del cultivo y de la adición de una combinación de auxinas y citoquininas, que se corresponde con el proceso de desdiferenciación celular. Durante el estado I, las células de mesófilo aisladas pierden su capacidad para realizar la fotosíntesis. Esta desdiferenciación implica la expresión de genes inducidos por el establecimiento del cultivo (herida) y la adquisición por parte de las células de la capacidad de crecer y volver a diferenciarse.

- Estado II: Las células desdiferenciadas restringen su potencial de desarrollo, se diferencian en células pro-cambiales y a continuación, parte de ellas se transforman en células del xilema.

- Estado III: La diferenciación de las traqueidas y de las células del parénquima ocurre a partir de estas células pro-cambiales. Este proceso de diferenciación implica la formación de la pared celular secundaria y, a continuación, la muerte celular programada (MCP) en el caso de las traqueidas. El paso del estado II

al estado III parece ser un punto sin retorno en la diferenciación de las traqueidas. Los efectos del calcio en este proceso están mediados, al menos en parte, por calmodulina. Durante el estado II, los niveles de calcio aumentan transitoriamente (Fukuda 1997) y se induce la expresión de varias proteínas que se unen a calmodulina. De hecho, los antagonistas de calmodulina inhiben específicamente la entrada del cultivo celular de *Z. elegans* en el estado III (Kobayashi y Fukuda 1994). Estos datos sugieren que el sistema calcio/calmodulina estaría implicado en la progresión del estado II y/o en la entrada al estado III. Esta hipótesis se ve sustentada en la presencia de niveles elevados de calcio en las células de *Z. elegans* que se diferencian a traqueidas (Roberts y Haigler 1989). Este proceso de diferenciación *in vitro* mimetiza el desarrollo de las células del xilema *in vivo*, en el que las células procambiales se diferencian a traqueidas y a células del parénquima.

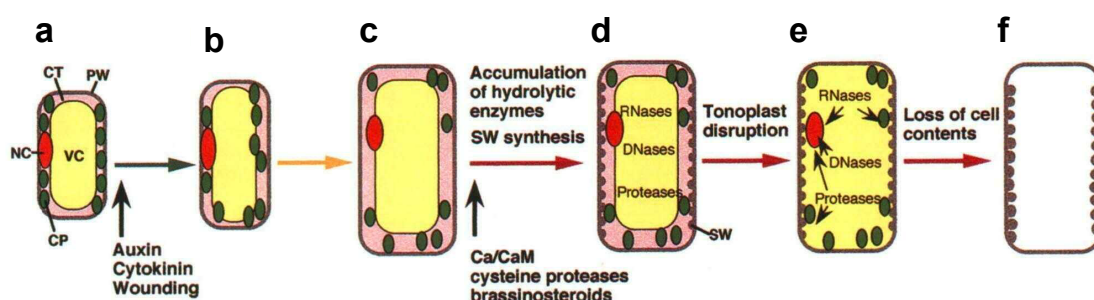


Figura 1.10. Célula de mesófilo (a), célula desdiferenciada (b), célula precursora de traqueida (c), traqueida inmadura (d), traqueida en diferenciación (e) y traqueida madura (f). La diferenciación se induce por el establecimiento del cultivo y por una combinación de auxinas y citoquininas. Las flechas verdes, amarillas y rojas muestran el progreso de los estados I, II y III, respectivamente. La transición del estado II al estado III parece regulada por calcio/calmodulina, cistein-proteasas y brasinoesteroides endógenos. Al comienzo del estado III se expresan genes implicados en la síntesis de la pared secundaria y en la autólisis. Enzimas hidrolíticas tales como ADNasas, ARNasas y proteasas se acumulan en la vacuola. La rotura del tonoplasto provoca la invasión del citoplasma por estas enzimas que atacan varios orgánulos, produciendo la formación de una traqueida que ha perdido sus contenidos celulares. CP: cloroplasto; CT: citoplasma; NC: núcleo; PW: pared primaria; SW: pared secundaria; VC: vacuola. Esquema tomado de Fukuda 1997.

III.2. Hormonas en la diferenciación de traqueidas

La inducción de traqueidas se ha realizado en callos, suspensiones celulares, células aisladas y explantes de tejidos, y se inicia en un medio de cultivo inductivo que contiene auxinas y citoquininas (Aloni 1987, Roberts y cols. 1988, Fukuda 1992).

Como resultado de un amplio rango de estudios fisiológicos, está generalmente aceptado que la auxina es uno de los principales inductores de la diferenciación a traqueidas (Aloni 1987, Sachs 2000, Church y Galston 1988, Fukuda y Komamine 1985, Fukuda 1992). Las citoquininas también promueven la inducción de la diferenciación a traqueidas *in vitro* (Fukuda y Komamine 1985, Aloni 1987), pero solamente en presencia de auxinas. Las citoquininas son necesarias para la diferenciación, pero las necesidades de éstas pueden estar limitadas a una etapa más

temprana de la diferenciación que en el caso de las auxinas (Fukuda y Komamine 1985, Church y Galston 1988). Junto a las auxinas y las citoquininas, los brasinoesteroides se sintetizan activamente durante el estado II y parecen ser esenciales para la diferenciación (Yamamoto y cols. 2001). Este no es el caso de las giberelinas y del etileno, hormonas cuyo papel parece ser secundario en la regulación de genes específicos y cuyos efectos son mimetizados por las auxinas (Fukuda 1992).

III.3. Formación de la pared secundaria

La producción de una gruesa pared secundaria compuesta por polisacáridos, proteínas estructurales y ligninas, es esencial para la formación de las traqueidas (Figura 1.11). Por lo general, los materiales que forman la pared celular secundaria comienzan a depositarse después de las 48 horas del inicio del cultivo, mientras que la deposición de las ligninas se observa entre las 60 y 72 horas (Fukuda 1997).



Figura 1.11. Células de mesófilo durante su diferenciación a traqueidas, donde se observa la formación de la pared celular secundaria (flechas).

Durante la formación de la pared secundaria se sintetizan polisacáridos, como celulosas y hemicelulosas, además de proteínas específicas de la pared. Estudios moleculares han permitido identificar estas proteínas estructurales (Cassab y Varner 1988, Keller 1994, Northcote 1995, Brown y cols. 2005, Yokoyama y Nishitani 2006, Kärkönen y cols. 2002, Blee y cols. 2001a, Hertzberg y cols. 2001, Ubeda-Tomas y cols. 2007), y se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: proteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina y proteína arabinogalactano (Fukuda 1996). Dentro de estas últimas, Motose y cols. (2001), identificaron una proteína de 25 kD que mediaba la comunicación intercelular local requerida para la diferenciación de las traqueidas. Este factor fue denominado “xilógeno” haciendo referencia a su actividad inductora de la xilogénesis.

También se han detectado actividades de algunas enzimas hidrolíticas, como poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, fucosidasa y xiloglucano endo-transglicosilasa, que incrementan su actividad al final del proceso de diferenciación (Stacey y cols. 1995, Pesquet y cols. 2005).

Por otra parte, el proceso más estudiado durante la formación de las traqueidas ha sido la síntesis de ligninas, que ocurre específicamente sobre las paredes secundarias. La biosíntesis de ligninas implica diferentes etapas, que conducen a la polimerización final de alcoholes cinamílicos en las paredes celulares. Algunas

enzimas como la fenilalanina amonioliasa, la cinamato hidroxilasa, la 4-cumarato: CoA ligasa, la O-metiltransferasa, la alcohol cinamildeshidrogenasa y las peroxidasas, son esenciales para la síntesis de ligninas durante la diferenciación a traqueidas (Higuchi 1985, Hahlbrock y Scheel 1989, Lewis y Yamamoto 1990). Estas proteínas se han utilizado como marcadores de la lignificación durante la diferenciación del xilema (Fukuda 1992).

III.4. Muerte celular programada

La MCP juega un papel importante en el desarrollo de los organismos multicelulares. En plantas, este proceso se produce en células específicas durante el desarrollo de los diferentes tejidos, donde se incluyen los órganos florales, los embriones, el sistema vascular, las hojas y las raíces (Jones y Dangl 1996). En los sistemas vasculares, la MCP juega un papel importante en la formación de los vasos y las traqueidas.

La diferenciación en traqueidas (Figura 1.11), es un ejemplo típico de MCP en plantas superiores (Pennell y Lamb 1997), en el que las células individuales degradan autónomicamente sus contenidos celulares en ausencia de un contacto con las células vecinas (Groover y cols. 1997). Las traqueidas alcanzan su madurez tras la pérdida de los contenidos celulares y estos incluyen la pérdida de los núcleos, plastidios, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (O'Brien 1981, Fukuda y Komamine 1985, Roberts y cols. 1988). El proceso de muerte celular tiene lugar al final del estado III de diferenciación de las traqueidas y es inmediatamente posterior a la formación de las paredes secundarias (Fukuda 1997).

Durante la autólisis, enzimas hidrolíticas, como cistein-proteasas, serin-proteasas, RNasas, nucleasas tipo-S1, fosfatasas ácidas y lipasas se expresan y catalizan la degradación de macromoléculas (Fukuda 2004). Estas enzimas se acumulan en la vacuola de las células hasta la lisis de este orgánulo (Fukuda y cols. 1998). A continuación, se produce una entrada masiva de calcio en el citosol (Groover y Jones 1999), la vacuola se colapsa, y las enzimas hidrolíticas degradan el citoplasma, incluyendo la membrana plasmática (Figura 1.12) (Obara y cols. 2001).

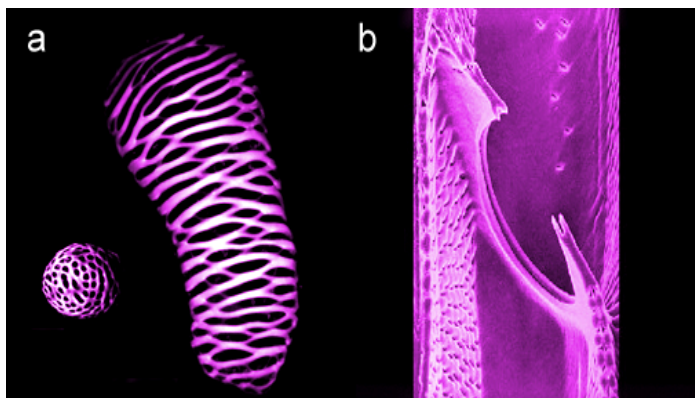


Figura 1.12. Tras la lisis y la pérdida del contenido celular, las traqueidas forman estructuras huecas reforzadas por paredes secundarias. Traqueida desde distintos ángulos (a) y vaso (b), imágenes obtenidas con microscopio confocal láser de barrido. Cortesía de Keisuke Obara (a).

La degeneración visible de todos los orgánulos, incluido el núcleo, comienza solamente tras la rotura del tonoplasto, que ocurre varias horas después de que los engrosamientos de la pared secundaria lleguen a ser visibles. Tras la rotura del tonoplasto, los orgánulos con una sola membrana, como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, se lisan, y a continuación se degradan aquellos que contienen una doble membrana (Figura 1.12) (Kuriyama y Fukuda 2000).

La rápida degeneración de los orgánulos durante la autólisis es el resultado de la actuación de una gran variedad conjunta de enzimas hidrolíticas (Fukuda 1997). Thelen y Northcote (1989) encontraron que las actividades de algunas ADNasas y ARNasas estaban estrechamente asociadas con la diferenciación de las traqueidas en las células de *Z. elegans*. Las nucleasas de 22, 25 y 43 kD aparecían 12 horas antes de la formación visible de las traqueidas, aumentando considerablemente sus niveles durante la última fase de la diferenciación. Por otro lado, Minami y Fukuda (1995) encontraron que la actividad de una cistein-proteasa de 30 kD se incrementaba transitoriamente al inicio de la autólisis, y era específica de la diferenciación de traqueidas en *Z. elegans*, ya que al inhibir la actividad de esta enzima en células que se estaban diferenciando se inhibía la degeneración del núcleo, sugiriendo que la cistein-proteasa tenía un papel clave en este proceso. Más recientemente, Groover y Jones (1999) encontraron que una proteasa de 40 kD se secretaba al medio en cultivos de células que se estaban diferenciando, y que su actividad se incrementaba conforme avanzaba el proceso de autólisis. Esta proteína se identificó como una serin-proteasa que actuaba como un factor que coordinaba la MCP y se ha identificado posteriormente en otros estudios (Pesquet y cols. 2005).

IV. Lignificación de la pared celular

IV.1. Ligninas en *Zinnia elegans*

Z. elegans es una planta anual con flores que pertenece a la familia de las Asteráceas (Figura 1.14a). Esta especie se usa ampliamente como modelo en los estudios de lignificación (Fukuda 1996) y es ideal, primero, debido a la simplicidad y la dualidad del patrón de lignificación que muestran los tallos y los hipocotilos (Figura 1.13) y, segundo, debido a la naturaleza del patrón isoenzimático de la peroxidasa, que se encuentra casi completamente restringido a la presencia de una única isoenzima de peroxidasa (Figura 1.13). Además, *Z. elegans* ofrece la posibilidad de trabajar con cultivos celulares que se asemejan a las células del xilema en diferenciación (Pesquet y cols. 2003) y de hecho, se ha usado como modelo para determinar la expresión de las enzimas de la ruta biosintética de las ligninas, especialmente el tramo correspondiente a los esqueletos fenilpropanoides (Demura y cols. 2002, Milioni y cols. 2002), gracias a que la diferenciación de las células de mesófilo a traqueidas se induce de manera sincrónica en una población celular relativamente homogénea, haciendo posible el estudio bioquímico y fisiológico de la

xilogénesis, libre de la complejidad impuesta por los tejidos vegetales heterogéneos (Roberts y McCann 2000, Milioni y cols. 2002).

Patrón de lignificación de Zinnia elegans

El patrón de lignificación de *Z. elegans* es especial ya que, en un determinado estado de desarrollo, ofrece simultáneamente los dos modelos de lignificación que encontramos en gimnospermas y angiospermas. Así, en plantas de 25-30 días, el análisis de los productos de oxidación con nitrobenzeno ha revelado que las ligninas del hipocotilo están formadas principalmente por unidades G/S en una relación 43/57, mientras que, las ligninas del tallo contienen cantidades considerables de unidades H, en una relación H/G/S de 22/56/22. Por tanto, las unidades S predominan en el hipocotilo, mientras que las unidades G lo hacen en el tallo. En este sentido, las ligninas del hipocotilo de *Z. elegans* son típicas de las angiospermas mientras que las ligninas del tallo se asemejan parcialmente a las de gimnospermas, ya que la suma (H+G) constituye el 78% de las tres unidades estructurales (Ros Barceló y cols. 2004).

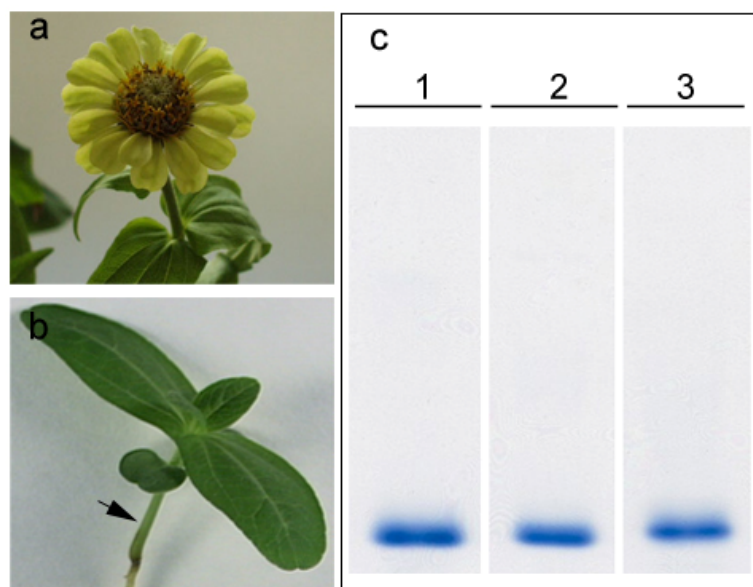


Figura 1.13. Planta de *Zinnia elegans* (a), mostrando hipocotilo (flecha) (b) e isoelectroenfoque que revela la presencia de la isoenzima de peroxidasa en hipocotilos (1), tallos (2) y cultivos celulares (3) de *Zinnia elegans* (c).

IV.2. Biosíntesis de ligninas

El proceso de la lignificación y la ruta de biosíntesis de las ligninas presentan numerosas cuestiones referentes, fundamentalmente, al orden de la ruta y al mecanismo de dicho proceso. Algunas de dichas cuestiones ya fueron planteadas por Neish (1968) y muchas de ellas se mantienen hoy día sin resolver. Este desconocimiento parcial del proceso puede justificarse, en parte, si se considera la gran dificultad que entraña de por sí su estudio, hecho que queda patente si se tiene

en cuenta la observación realizada por Sederoff y cols. (1994), quienes puntualizaron que no existe un tejido o especie vegetal donde se haya caracterizado completamente la ruta entera de la biosíntesis de las ligninas. Todo ello motiva que los conocimientos que se tienen actualmente sobre dicho proceso sean fragmentarios y hayan sido obtenidos del estudio concreto de ciertos pasos específicos en diversas especies y tejidos vegetales.

La biosíntesis de las ligninas (Figura 1.14) se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones que implican:

i) La ruta del sikimato, que produce L-fenilalanina y L-tirosina y que se inicia con fosfoenol piruvato (PEP, un intermediario de la glucólisis) y eritrosa 4-fosfato (un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato) (Herrmann 1995).

ii) La ruta común fenilpropanoide, desde L-fenilalanina (y/o L-tirosina) hasta *p*-hidroxicinamoil-CoA. Las enzimas que participan en esta ruta son la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11), la *p*-cumarato-3-hidroxilasa (C3H), y las *O*-metil-transferasas (OMT) dependientes de *S*-adenosil-*L*-metionina, tales como la cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa (CCoAOMT, EC 2.1.1.104) y la *p*-hidroxicinamato CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12). Los productos finales de esta ruta, los ésteres CoA de los ácidos cinámicos, son los precursores de las ligninas, pero también de otros compuestos fenólicos como los flavonoides y los taninos, que se acumulan en grandes cantidades en las células vegetales.

iii) La ruta específica de la biosíntesis de las ligninas, que conduce el *p*-hidroxicinamoil-CoA hacia la síntesis de los alcoholes cinamílicos. Estas dos reacciones son catalizadas por las enzimas *p*-hidroxicinamoil-CoA reductasa (CCR, EC 1.2.1.44) y la *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195) en sus formas coniferil alcohol deshidrogenasa (CAD) y sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD). Intercalada entre estos dos pasos reductores hay una reacción catalizada por la coniferilaldehído-5-hidroxilasa (CAld5H), que está acoplada con una OMT específica (AldOMT), y que permite la síntesis de unidades siringilo en las angiospermas (Franke y cols. 2000, Osakabe y cols. 1999, Li y cols. 2000).

El último paso en el proceso de la biosíntesis de las ligninas es la oxidación de los alcoholes cinamílicos en la pared celular para dar lugar a la formación de los correspondientes radicales 4-*O*-fenoxilo, los cuales polimerizan espontáneamente para dar dímeros y oligómeros y, en reacciones posteriores, un polímero creciente de lignina.

Las plantas son los únicos organismos vivos capaces de conducir el carbono desde el metabolismo primario al secundario a través de la biosíntesis de ligninas, y se acepta que la adquisición evolutiva de la ruta fenilpropanoide ha jugado un papel clave en la capacidad de las plantas para colonizar la tierra, no solo porque uno de los productos de la ruta (las ligninas) sirve para fortalecer los órganos aéreos de la planta, sino también porque otros productos (los flavonoides) actúan como protectores contra la radiación UV. Para integrar esta nueva ruta evolutiva y la ruta general de biosíntesis

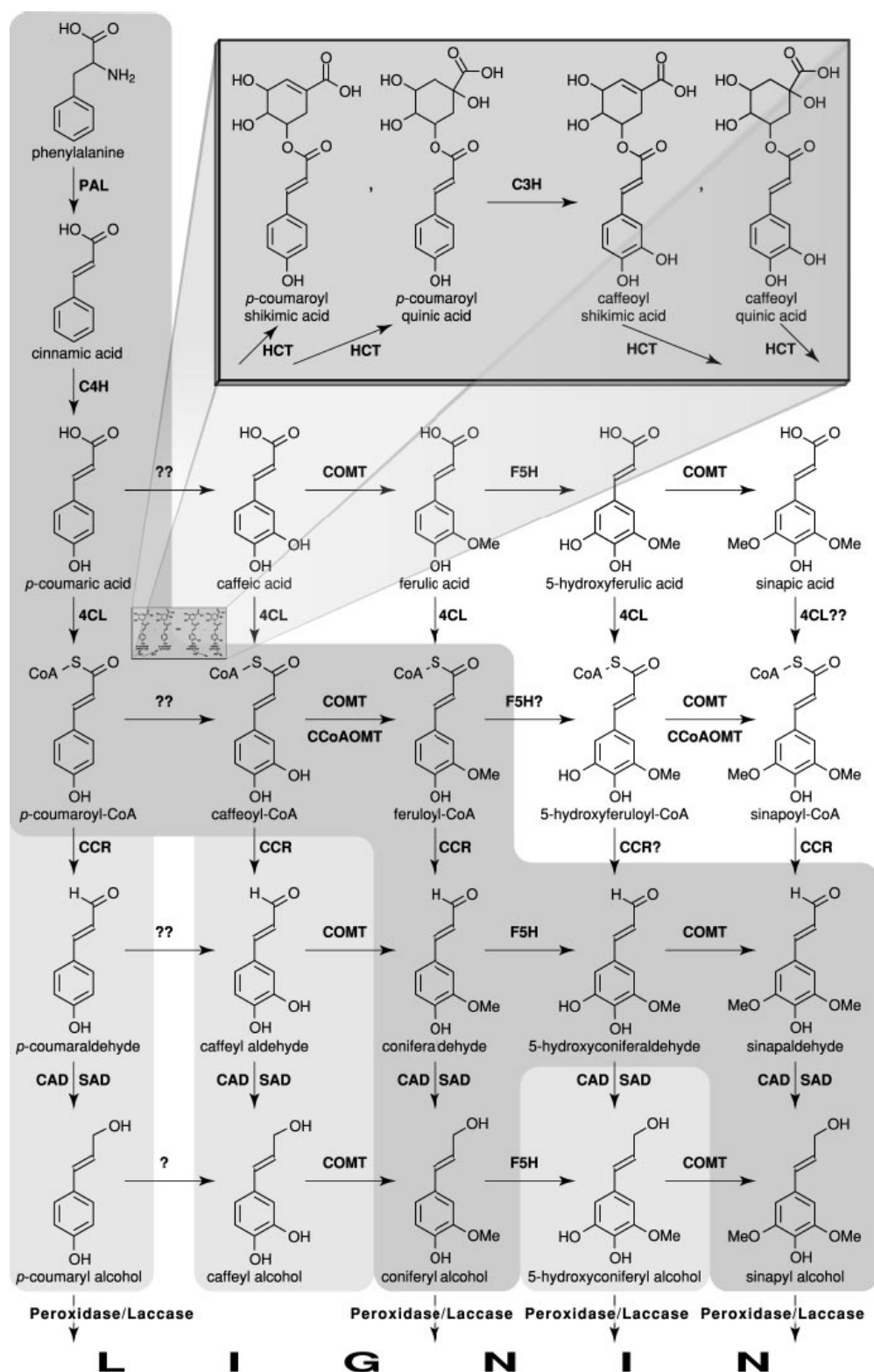


Figura 1.14. Rutas biosintéticas fenilpropanoide y de los monolignoles. La parte gris oscura se encuentra favorecida en angiospermas. La parte gris clara también ocurre dependiendo de las condiciones y de las diferentes especies. La parte blanca no juega un papel crucial en la biosíntesis de los monolignoles. CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; 4CL: 4-cumarato:CoA ligasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; CCoAOMT: cafeoil-CoA-O-metiltransferasa; CCR: cinamoil-CoA reductasa; COMT: ácido caféico O-metiltransferasa; HCT: *p*-hidroxycinamoil-CoA: quinato sikimato *p*-hidroxicinamoiltransferasa; F5H: ferulato 5-hidroxilasa; PAL: fenilalanina amonioliase; SAD: sinapil alcohol deshidrogenasa. Tomado de Boerjan y cols. 2003.

de los aminoácidos aromáticos en el eficiente metabolismo de las plantas vasculares, las actividades de las enzimas de la ruta del sikimato están estrechamente coordinadas con las actividades de las enzimas de la ruta fenilpropanoide (Whetten y Sederoff 1995).

IV.2.1. Regulación transcripcional de la lignificación

Las células lignificadas constituyen un importante sumidero de carbono y además no pueden expandirse debido a la deposición de lignina, por lo que la lignificación debe ocurrir después de que la célula se haya dividido y aumentado de tamaño. Dado el coste metabólico de construir el polímero de lignina, junto con su persistencia y las propiedades de las células lignificadas, el momento y la localización de la lignificación deben estar fuertemente regulados. Las plantas incapaces de sintetizar cantidades normales de lignina pierden su capacidad de sostener su porte (Zhong y cols. 1997, Jones y cols. 2001) y, en algunos casos, de defenderse frente a patógenos (Franke y cols. 2002).

La regulación de la biosíntesis de ligninas se ha estudiado principalmente mediante el análisis de los promotores de los genes implicados (Devan y cols. 1989, Bell-Lelong y cols. 1997, Douglas y cols. 1991, Capellades y cols. 1996). Mediante análisis de delección en los promotores de los genes *PAL* y *4CL* (Hauffe y cols. 1991, Levya y cols. 1992) se identificaron elementos *cis* críticos para la expresión específica en los distintos tejidos.

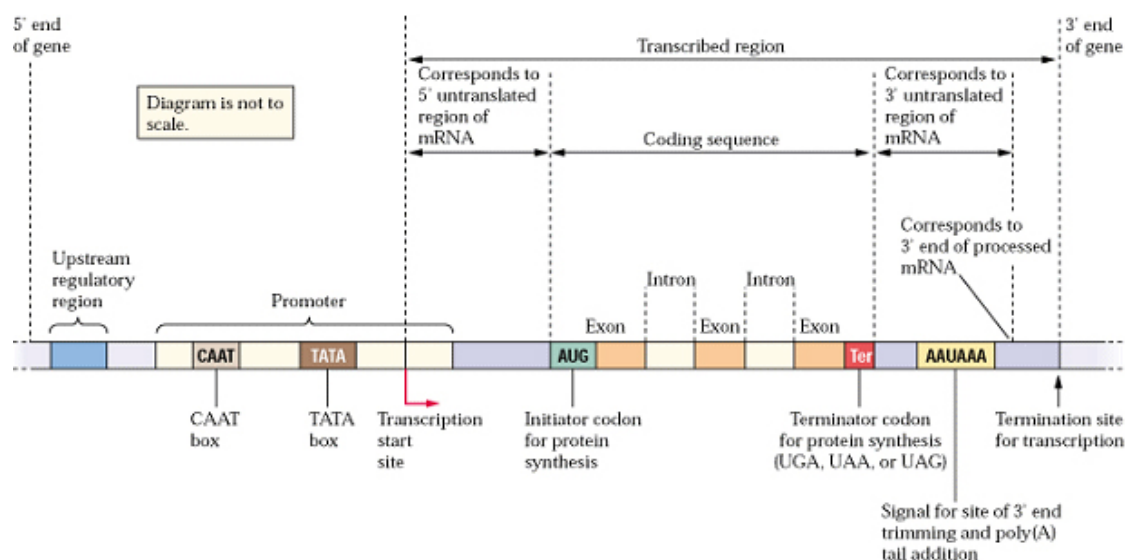


Figura 1.15. Estructura y organización de un gen eucariota. El gen se divide en varias secciones. La región transcrita actúa como molde para la síntesis de ARN, que se edita y traduce en el producto proteico del gen. La región transcrita contiene secuencias codificantes (exones) y secciones no codificantes (intrones). La región transcrita está flanqueada a ambos lados por secuencias no codificantes que actúan en la regulación del gen. La mayoría de los elementos de las secuencias reguladores están en la región 5'. Los primeros 1000 pb de la región 5' se denominan promotor, ya que contiene secuencias importantes para la “promoción” de la transcripción. Estos motivos se llaman “elementos *cis*”. El elemento *cis* más conservado es la caja TATA, que habitualmente se encuentra en los primeros 50 pb del punto de inicio de la transcripción. Tomado de Buchanan y cols. 2000.

Los elementos *cis* (Figura 1.15) son elementos localizados en la misma hebra que la región codificante del gen. El elemento *cis* más básico es la caja TATA, presente en la mayoría de genes eucariotas y responsable de la correcta unión de la ARN polimerasa II para iniciar la transcripción. Otro elemento *cis* es la caja CAAT. Los genes inducibles casi siempre contienen una caja TATA y al menos otros dos elementos *cis* que juegan un papel importante en las etapas finales de la transducción de señales ambientales (Buchanan y cols. 2000).

Los elementos *cis* pueden actuar como activadores, contribuyendo a la eficiencia de la ARN polimerasa II en el inicio de la transcripción del gen. Los activadores pueden funcionar en cualquier orientación del cromosoma y estar localizados a una gran distancia de la región codificante del gen. Los activadores pueden regular la especificidad de expresión, dictando si un gen se expresa en un tejido u órgano. Esta función se mantiene aunque el activador se elimine de su contexto normal y se coloque en otro gen, donde se impone la expresión específica de tejido en el nuevo gen. En contraste con los activadores, los silenciadores disminuyen la expresión génica y son estructuralmente parecidos a los activadores (Buchanan y cols. 2000).

El análisis de la región reguladora 5' de varios genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de ligninas revela un motivo común. Los promotores de estos genes se caracterizan por la presencia de motivos conservados, conocidos como elementos AC, cajas H o cajas PAL (Bell-Lelong y cols. 1997, Lacombe y cols. 2000, Lauvergeat y cols. 2002). Estos motivos deben su nombre a que son ricos en citosina y adenosina, y se encuentran en los genes de PAL, C4H, COMT, CCoAOMT, 4CL, CCR y CAD. La ubicuidad de estos elementos en los promotores de estos genes sugiere que podrían actuar como una diana dentro de un mecanismo regulador común (Patzlaff y cols. 2003). De los 12 genes que se enumeran como participantes directos en la biosíntesis de ligninas en *Arabidopsis thaliana*, 10 de ellos contienen al menos una copia de un elemento AC (Rogers y Campbell 2004). Además de los elementos AC, existen otros elementos *cis*, como el elemento FP56 identificado en el promotor de 4CL, que también tienen importancia en la regulación de la expresión génica (Neustaedter y cols. 1999).

Existen factores de transcripción que interaccionan con los elementos AC y que podrían estar implicados en el control de la lignificación. La familia de factores transcripcionales MYB es una de las clases más abundantes en las plantas y la subfamilia que contiene el dominio R2R3 de unión al ADN es la más grande (Stracke y cols. 2001). Algunas proteínas R2R3-MYB que se unen a los elementos AC se hallaron en los promotores de varios genes del metabolismo fenilpropanoide (Grotewold y cols. 1994, Sablowski y cols. 1994) y se ha sugerido que estos motivos comunes podrían proveer un mecanismo por el que diferentes pasos del metabolismo fenilpropanoide se regulen de forma coordinada (Douglas 1996, Martin y Paz-Ares 1997, Weisshaar y Jenkins 1998). De hecho, muchas proteínas R2R3-MYB tienen funciones en la regulación de la biosíntesis fenilpropanoide y regulan la biosíntesis de

compuestos fenólicos incluyendo la lignina (Borevitz y cols. 2000, Goicoechea y cols. 2005, Jin y cols. 2000, Patzlaff y cols. 2003, Tamagnone y cols. 1998).

El potencial de las proteínas R2R3-MYB de unirse a los elementos AC y regular la lignificación se demostró por primera vez en *Antirrhinum majus* L. (Tamagnone y cols. 1998). Cuando alguna de las proteínas *AmMYB308* o *AmMYB330* se sobreexpresa en tabaco transgénico se acumulan menos compuestos fenólicos que en las plantas controles y se reduce la cantidad de ligninas en los tejidos vasculares.

En *Pinus taeda* la proteína *PtMYB4* (Patzlaff y cols. 2003) es capaz de unirse y de activar la transcripción de los mismos elementos AC que se implican en la expresión en el xilema de los genes que codifican para las enzimas de la ruta de biosíntesis de las ligninas. De hecho, cuando se sobreexpresa, aumentan los transcritos de genes implicados en la biosíntesis de ligninas. Además, también se produjo lignificación en células que normalmente no lignifican, hecho conocido como lignificación ectópica. Se ha visto una relación entre la lignificación ectópica y la actividad de la familia de proteínas R2R3-MYB (Patzlaff y cols. 2003, Newman y cols. 2004, Rogers y cols. 2005).

Aunque esta familia de proteínas son suficientes para inducir la lignificación, todavía se desconoce si son necesarias para la misma. Por ejemplo, dos factores transcripcionales MADS de *Arabidopsis thaliana* SHATTERPROOF (SHP)1 Y SHP2 son necesarios para la lignificación de las valvas de la silicua y son suficientes para incrementar la lignificación cuando se sobreexpresan en plantas transgénicas (Liljegren y cols. 2000).

Existen otros factores transcripcionales que tienen la capacidad de regular la expresión de algunos genes de la biosíntesis de ligninas. Se ha encontrado en tabaco un miembro de la familia LIM (*NtLIM1*) capaz de unirse a un elemento AC implicado en la expresión específica en el xilema de genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de ligninas (Kawaoka y cols. 2000). La supresión de *NtLIM1* conlleva una disminución de los transcritos de varios genes implicados en la biosíntesis de ligninas y una reducción del contenido de lignina.

Nuestro grupo de investigación está caracterizando actualmente el promotor de la peroxidasa de *Zinnia elegans*, que muestra elementos *cis* de respuesta a diferentes hormonas y al peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (Ros Barceló y cols. 2008), lo que da idea de su alto grado de regulación.

IV.2.2. La etapa de polimerización

La etapa de polimerización es el último paso en el proceso de la biosíntesis de ligninas a partir de los alcoholes cinamílicos. Consiste en la oxidación, catalizada por las peroxidasas de clase III, de los alcoholes cinamílicos a radicales 4-O-fenoxilo que polimerizan espontáneamente para dar oligómeros y, en etapas subsecuentes, un polímero creciente de lignina (Higuchi 1990, Hapiot y cols. 1994). Dichos radicales fenoxilo pueden acoplarse entre ellos dando lugar a los diferentes bloques estructurales que aparecen en las ligninas naturales.

Los alcoholes hidroxicinamílicos son dimerizados y polimerizados en las paredes celulares del xilema en una reacción dependiente del H_2O_2 (Nose y cols. 1995, Ros Barceló y Pomar 2001) suministrado por una enzima tipo NADPH oxidasa (Ros Barceló 1998a). Los dímeros de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (los dilignoles), no son los productos finales de la ruta y pueden ser oxidados por las peroxidasas para producir un polímero creciente de lignina que permanece anclado a la pared celular (Figura 1.15). Las ligninas se pueden unir a los polisacáridos de la pared celular por la adición nucleofílica de los grupos hidroxilo de los polisacáridos a la estructura metiluro quinona que resulta del acoplamiento β -O-4 de dos radicales monolignoles. A través de este mecanismo, las ligninas aportan fuerza a las paredes celulares vegetales, facilitan el transporte de agua e impiden la degradación de los polisacáridos de la pared, actuando así como una mejor línea de defensa contra vertebrados herbívoros, insectos y hongos.

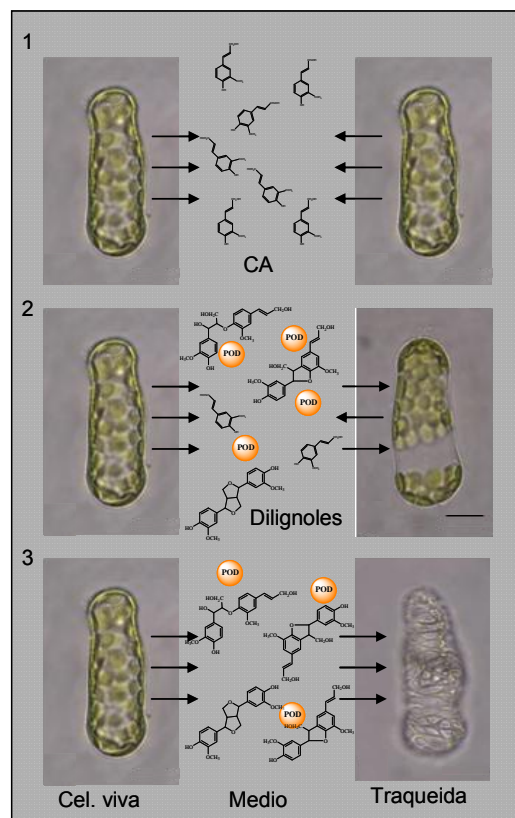


Figura 1.16. Modelo de lignificación mediado por dilignoles durante la diferenciación a traqueidas de las células de mesófilo de *Zinnia elegans*. El alcohol coniferílico se secreta desde las traqueidas en diferenciación y las células parenquimáticas, y se acumula en el medio (1). Tras el inicio de los engrosamientos de la pared celular secundaria de las traqueidas, el alcohol coniferílico secretado se dimeriza rápidamente en dilignoles por las peroxidasas que se liberan al medio y/o se localizan en las paredes celulares secundarias de las traqueidas (2). Los dilignoles se polimerizan en ligninas por la peroxidasa unida a las paredes celulares secundarias de las traqueidas, incluso después de sufrir la muerte celular programada (3). N: núcleo; C: cloroplasto; V: vacuola; CA: alcohol coniferílico; PO: peroxidasa. TE: elementos traqueales. Esquema tomado de Tokunaga y cols. 2005.

De forma general se ha considerado que las peroxidasas son las principales enzimas implicadas en esta etapa de polimerización, ya que presentan una correlación tanto espacial como temporal con la lignificación de la pared celular. No obstante, los resultados de diversos estudios realizados en los últimos años han motivado un resurgimiento de aquellas teorías en las que se sugería que otras enzimas, tales como las lacasas, podrían desempeñar un papel clave en los procesos de polimerización de los alcoholes cinamílicos (O'Malley y col. 1993, Dean y Eriksson 1994).

Lewis y Yamamoto (1990) establecieron cuatro criterios básicos que deberían cumplir aquellas enzimas implicadas en la polimerización de los alcoholes cinamílicos en la pared celular. Estos criterios son:

- i) mostrar una especificidad de sustrato por los alcoholes cinamílicos
- ii) presentar una localización subcelular en la pared celular
- iii) conocerse su estructura primaria
- iv) presentar una correlación temporal con las fases de lignificación activa de la pared celular.

A estos cuatro criterios, Ros Barceló (1997) añadió dos nuevos:

- v) que la enzima presente una extensa distribución dentro de todas las especies de plantas vasculares hasta ahora conocidas
- vi) que la enzima presente una alta afinidad para los alcoholes cinamílicos durante su oxidación a compuestos de tipo lignina.

Muy pocas de las enzimas que actualmente se cree que pueden estar implicadas en la lignificación reúne todos estos requisitos antes mencionados. En el caso de las lacasas, éstas presentan una baja afinidad por los alcoholes cinamílicos, una incapacidad manifiesta de formar compuestos altamente polimerizados de tipo lignina y, en muchos casos, una falta de correlación cuantitativa entre los niveles de la enzima y la lignificación (Alba y cols. 1996). En el caso de las peroxidasas resulta difícil imaginar que una única isoenzima sea la responsable en exclusiva de un proceso tan complejo y organizado como es la polimerización de los alcoholes cinamílicos a ligninas. No obstante, las peroxidasas reúnen bastantes de los requisitos previamente definidos. Así, estas enzimas muestran una gran afinidad por los alcoholes cinamílicos durante su oxidación a compuestos de tipo lignina, muestran una correlación cuantitativa con la lignificación de la pared celular y, por último, están presentes en altos niveles en los tejidos lignificantes de todas las plantas vasculares.

IV.2.3. Restricciones impuestas por el mecanismo de polimerización

El mecanismo de polimerización, tal como actualmente es conocido (Freudenberg y cols. 1965, Hatfield y Vermerris 2001), impone ciertas restricciones al proceso de lignificación. Si los sustratos (los monolignoles y el H_2O_2) son suministrados a las células del xilema por las células del parénquima vecinas, como parece probable (Hosokawa y cols. 2001, Ros Barceló y Pomar 2003), se puede esperar un gradiente de difusión de los bloques de lignina desde la membrana

plasmática de las células del parénquima hasta las paredes celulares secundarias de los vasos del xilema. Este gradiente de concentración, probablemente, también ocurre para la peroxidasa que se concentra principalmente en la lámina media debido a sus propiedades de unión a las pectinas (Ferrer y cols. 1992, Carpin y cols. 2001), y cuyos niveles en las paredes celulares secundarias son bajos comparados con los niveles en las paredes celulares primarias. Esto produce dos zonas topográficas claramente definidas en las paredes celulares lignificantes:

- Una (caracterizada por elevados niveles de peroxidasa y alta difusión de sustratos) localizada en la pared celular primaria de las células del parénquima del xilema y de los vasos.
- Otra (caracterizada por bajos niveles de peroxidasa y baja difusión de sustratos) localizada más allá de las paredes celulares primarias, por ejemplo, en los engrosamientos de la pared celular secundaria de los vasos del xilema.

Esto produce dos tipos de polimerización: una rápida (en la pared celular primaria) y la otra lenta (en la pared celular secundaria). La polimerización rápida, como probablemente ocurre en la lámina media y en las paredes celulares primarias, favorece el acoplamiento C-C de los monolignoles en polímeros muy ramificados, ricos en enlaces interunitarios β -5, β -1, β - β , 5-5 y 5-O-4. En contraste, la polimerización gradual que ocurre en las paredes celulares secundarias, favorece el acoplamiento β -O-4 de los monolignoles en polímeros relativamente lineales (Lai y Sarkanen 1975), un proceso favorecido a pH 5,5 (Grabber y cols. 2003), el pH de la pared celular secundaria de los elementos del xilema (Roberts y Haigler 1994). El hecho de que estos dos tipos de polimerización ocurran en las paredes celulares lignificantes se apoya tanto en medidas *in situ* como en cálculos teóricos de la reactividad de los radicales. Así, las ligninas ricas en residuos H son depositadas principalmente en las paredes celulares primarias y están fuertemente entrecruzadas (Terashima y Fukushima 1988, Chabannes y cols. 2001, Ruel y cols. 2002), mientras que las ligninas ricas en residuos G y S son principalmente depositadas en las paredes celulares secundarias, y el polímero formado es principalmente lineal, en el que los esqueletos de los monolignoles se unen por enlaces β -O-4 (Chabannes y cols. 2001, Ruel y cols. 2002).

IV.2.4. Restricciones impuestas por la heterogeneidad de los monómeros

Desde una perspectiva evolutiva, las ligninas están uniformemente distribuidas desde las pteridofitas y las gimnospermas primitivas hasta las monocotiledóneas más evolucionadas. Con muy pocas excepciones, la ruta de los monolignoles, que proporciona las ligninas en las pteridofitas y en las gimnospermas, sólo utiliza los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, mientras que en angiospermas la ruta biosintética de las ligninas se ramifica para usar el alcohol sinapílico como sustrato. La ruta biosintética de las ligninas, al menos hasta donde concierne a sus precursores, los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, está muy conservada a lo largo de la evolución de las plantas vasculares y, sólo en grupos recientes (las angiospermas), el alcohol

sinapílico forma parte de los bloques estructurales. Sin embargo, los análisis por tioacidólisis y RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de la fracción β -O-4 de la lignina de varias gimnospermas y angiospermas revelan la presencia de otros monómeros menores, además de los monolignoles principales, cuya presencia en una especie vegetal dada depende de su posición filética.

Así, aunque la mayoría de los bloques encontrados en las ligninas naturales son principalmente derivados de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos, la RMN confirma que los *p*-hidroxicinamaldehídos también se incorporan en los polímeros crecientes de lignina, siendo esto especialmente evidente en los mutantes de la CAD (Kim y cols. 2002).

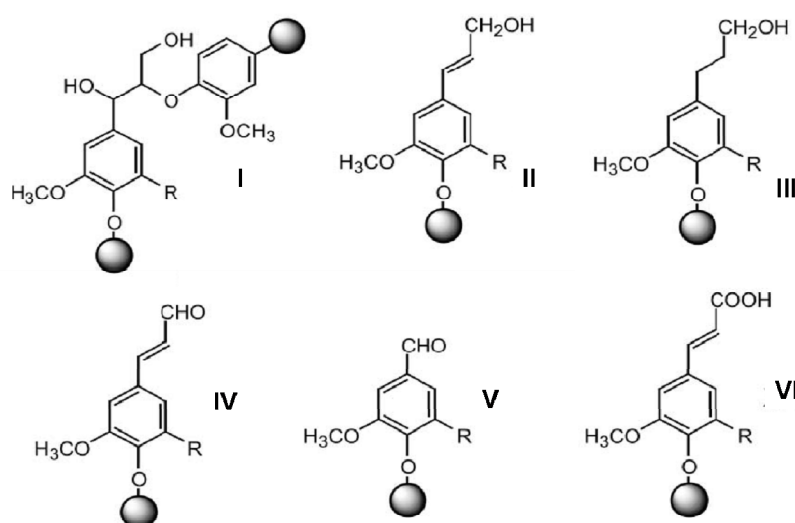


Figura 1.17. Estructuras de los monolignoles unidos por enlaces β -O-4 (I), monolignoles O-4-terminales (II), dihidromonolignoles O-4-terminales (III), *p*-hidroxicinamaldehídos O-4-terminales (IV), *p*-hidroxybenzaldehídos O-4-terminales (V), y ácidos *p*-hidroxicinámicos O-4-terminales (VI) observados por tioacidólisis.

De hecho, la incorporación de los *p*-hidroxicinamaldehídos en las ligninas es un proceso bastante selectivo, en el que el sinapilaldehído forma enlaces β -O-4 con unidades guaiacilo y siringilo, mientras que el coniferilaldehído sólo forma enlaces β -O-4 con unidades siringilo (Kim y cols. 2002).

La tioacidólisis es capaz de revelar la presencia de componentes inusuales en las paredes lignificadas (Lapierre y cols. 1995; Ros Barceló y cols. 2003). La mayoría de estos compuestos aparecen como unidades O-4-terminales (Figura 1.17), sugiriendo que la heterogeneidad en la composición monomérica de ligninas parece principalmente restringida a los enlaces O-4-terminales, mientras que el núcleo lineal β -O-4 (Figura 1.17) está compuesto exclusivamente de alcohol coniferílico unido por enlaces β -O-4 (en gimnospermas) o por unidades intercaladas de alcohol coniferílico y sinapílico unidas por enlaces β -O-4 (en angiospermas). Estas unidades O-4-terminales actúan como puntos de nucleación (iniciación) para el crecimiento de las ligninas (Figura 1.18), y surgen del enlace en la posición β de un radical monolignol (alcohol coniferílico o sinapílico) con la especie radical del grupo fenólico en la posición O-4, al

cual se unirían en pasos sucesivos los radicales de los alcoholes cinamílicos (Figura 1.18), permitiendo a la red de lignina crecer indefinidamente.

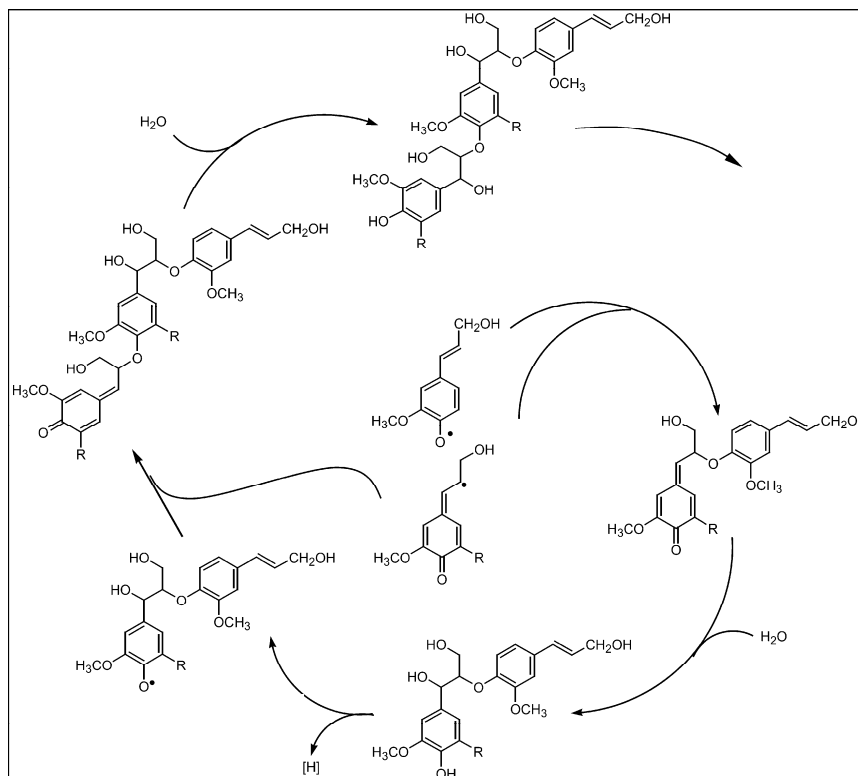
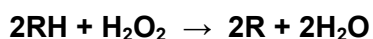


Figura 1.18. Flujo esquemático de la adición de los radicales coniferilo y sinapilo en la posición β a la especie radical del alcohol coniferílico en la posición O-4. La red de lignina surge del acoplamiento de un radical monolignol en su posición β con otro radical monolignol en posición O-4, de forma que el radical fenólico actuaría como punto de nucleación, al cual, se unirían en pasos sucesivos los radicales de los alcoholes cinamílicos. R= H, coniferilo; R= OCH₃, sinapilo.

V. Las Peroxidasas vegetales

Las peroxidasas (H₂O₂: donador de hidrógeno: H₂O₂ oxidoreductasas) son hemoproteínas que catalizan la oxidación monoeléctrica de diferentes sustratos a expensas del H₂O₂:



Las peroxidasas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, habiéndose encontrado en Euglenofitas (Shigeoka y cols. 1980), Rodofitas (Collen y cols. 1994), Clorofitas (Vanden Driessche y cols. 1984, Weger 1997), Briofitas (Matlok y cols. 1989), Pteridofitas (Bakardjieva y cols. 1996), y en todas las Espermatofitas estudiadas (Siegel 1993).

Las peroxidasas se clasifican en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra superfamilia no relacionada

estructuralmente con la anterior constituida por las peroxidasas animales (Welinder 1992, Hiraga y cols. 2001). A su vez, dentro de la superfamilia de las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas se han definido tres clases en base a las diferencias estructurales que existen entre ellas:

- Clase I: está compuesta por la citocromo c peroxidasa mitocondrial de levaduras, la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de plantas superiores y las peroxidasas bacterianas (Jespersen y cols. 1997). No poseen naturaleza glicoprotéica, están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol, y muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico. Adicionalmente, estas peroxidasas de la clase I son inhibidas por reactivos del grupo tiol como el *p*-cloromercurobenzoato y, en general, son consideradas como muy termolábiles.

- Clase II: agrupa a todas las peroxidasas fúngicas de secreción (manganeso peroxidasas).

- Clase III: contiene todas las peroxidasas vegetales de secreción y muestran características distintas a otras peroxidasas vegetales. Son de naturaleza glicoprotéica, están localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares. Estas peroxidasas muestran una baja especificidad de sustrato, con una moderada, pero notable, afinidad por el alcohol coniferílico, además de presentar una inusual estabilidad térmica. Todas estas características las distinguen de las ascorbato peroxidasas vegetales (clase I).

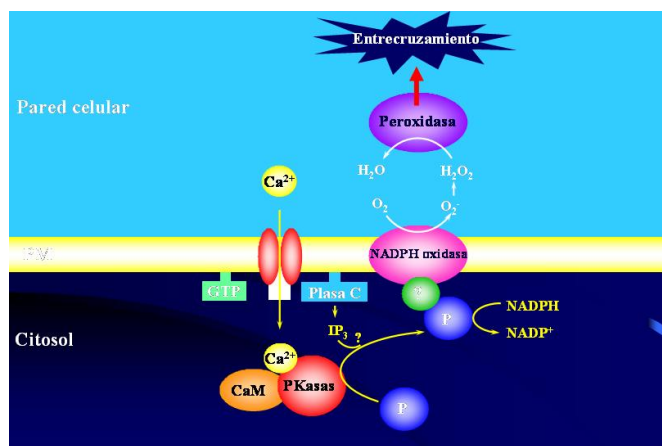


Figura 1.19. Esquema propuesto para ilustrar la naturaleza, la localización y la regulación del sistema de producción de H_2O_2 y su utilización por la peroxidasa en el xilema lignificante de *Zinnia elegans*.

V.1. Naturaleza y estructura

Las peroxidasas vegetales de secreción (EC.1.11.1.7) son glicoproteínas cuyo peso molecular generalmente está comprendido entre 30 y 45 kD (McMannus y Ashford 1997). Contienen como grupo prostético una molécula de protohemina IX (hemo b). En su estado nativo, el átomo de hierro se encuentra en el estado de

oxidación formal +3 [Fe(III)] (Figura 1.20). Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno de la estructura tetrapirrólica del grupo hemo, y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina proximal. La sexta posición de coordinación se encuentra libre determinando así el estado de alto espín para el hierro (Banci 1997). El grupo prostético (Figura 1.21) resulta esencial para la actividad enzimática ya que su eliminación provoca la total inactivación de la enzima (Chibbar y cols. 1984).

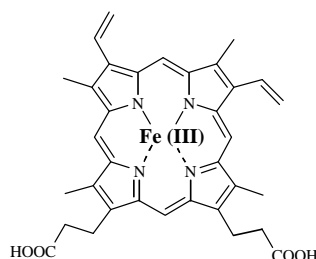


Figura 1.20. Grupo hemo b. El hierro se encuentra en su estado de oxidación formal +3 [Fe(III)]. Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno de la estructura tetrapirrólica del grupo hemo, y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina proximal. La sexta posición de coordinación se encuentra libre determinando así el estado de alto espín para el hierro. Este grupo prostético resulta esencial para la actividad enzimática ya que su eliminación provoca la total inactivación de la enzima.

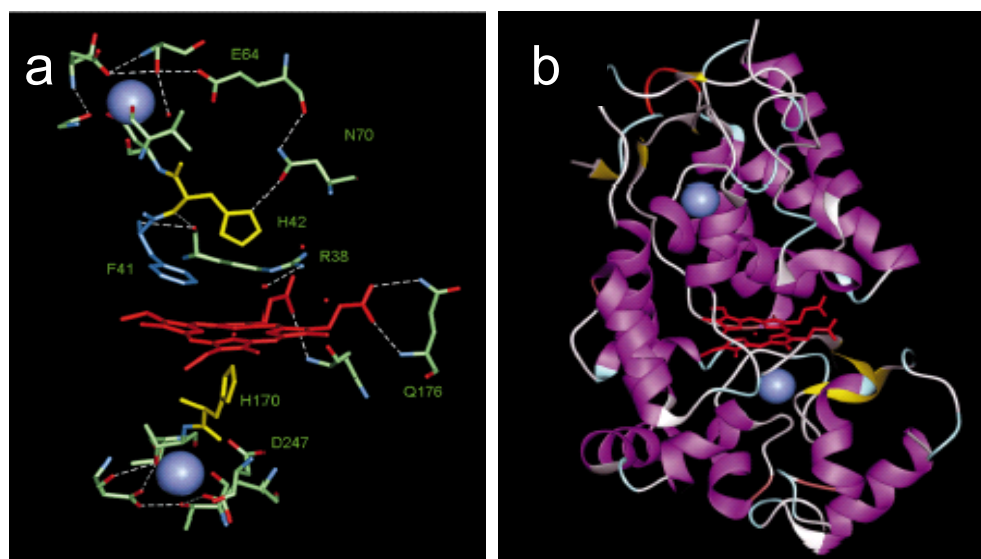


Figura 1.21. Ordenación espacial del centro activo de las peroxidasas. El grupo hemo (en rojo) está coordinado por la histidina proximal, H170, y el sexto sitio de coordinación está vacante (a). Estructura tridimensional de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRP C); las regiones plegadas helicoidalmente se muestran en púrpura, y las láminas- β en amarillo (b). El grupo hemo se encuentra entre los dominios distal (arriba) y proximal (abajo) de la enzima. Los dos sitios de unión al calcio se muestran como esferas azules. Tomado de Smith and Veitch 1998.

En la estructura plegada se observa la presencia de dos iones Ca^{2+} estructurales (Barber y cols. 1995) necesarios para su estabilidad (Pappas y Cass 1993). Además de estabilizar la estructura plegada, el Ca^{2+} también es considerado un activador de las peroxidasas vegetales de secreción (Iori y cols. 1995, Converso y Fernández 1996).

Los ADN complementarios (ADNc) que codifican la peroxidasa han sido aislados de varias especies vegetales (Bartonek-Roxa y cols. 1991, Tyson y Dhindsa 1995), entre ellas *Arabidopsis thaliana* (Østergaard y cols. 1996), *Zea mays* (Teichmann y cols. 1997), *Ipomoea batatas* L. (Huh y cols. 1997), *Asparagus officinalis* L. (Holm y cols. 2003), *Solanum tuberosum* L. (Huh y cols. 1997, Kim y cols. 2002), *Phaseolus vulgaris* L. (Blee y cols. 2001b), *Zinnia elegans* (Gabaldón y cols. 2005).

La clonación, expresión y análisis de los ADNc y los ADN genómicos de las peroxidasas de plantas superiores se ha llevado a cabo con éxito en varias ocasiones (Yoshida y cols. 2003, Fossdal y cols. 2001, Assigbetse y cols. 1999, Carpin y cols. 2001, Christensen y cols. 2001, Cheong y cols. 2002, Fujiyama y cols. 1990, Hiraga y cols. 2000, Botella y cols. 1993, Collinge y Boller 2001, Ito y cols. 2000). La mayoría de los ARNm de las peroxidasas vegetales codifican un péptido señal de entrada al retículo endoplásmico que dirige a la proteína hacia la ruta de secreción. Algunos ARNm, como en el caso de la peroxidasa de rábano C y la peroxidasa 1 de cebada, también poseen un propéptido carboxi-terminal que puede ser responsable de su deposición en las vacuolas (Welinder 1992, Carpin y cols. 1999).

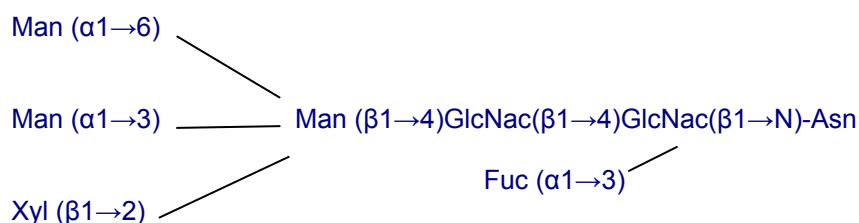


Figura 1.22. Estructura del glicano mayoritario de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRP). Tomado de McMannus y Ashford 1997.

La glicosilación de la enzima varía entre el 0 y el 25 %, siendo los principales azúcares la *N*-acetilglucosamina, la manosa, la fucosa y la xilosa. La mayoría de los oligosacáridos tienen un alto contenido en manosa (Figura 1.22) (Gray y cols. 1996, Yang y cols. 1996, McMannus y Ashford 1997, Wilson 2002). La glicosilación es uno de los factores principales que determinan la inusual estabilidad térmica de las peroxidasas vegetales de secreción (McEldoon y Dordrick 1996) ya que la eliminación de estos oligosacáridos normalmente afecta la cinética de las peroxidasas, su estabilidad térmica, su resistencia a las proteasas (por ejemplo tripsina), su estructura secundaria, y sus propiedades inmunológicas (Sánchez-Romero y cols. 1994, Tams y Welinder 1995, Duarte-Vázquez y cols. 2003).

V.2. Polimorfismo

Las peroxidasas vegetales de secreción son un grupo de enzimas que muestran un alto grado de polimorfismo, cuya extensión puede ser fácilmente estudiada mediante enfoque isoeléctrico. De acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), las isoenzimas de la peroxidasa se clasifican en ácidas ($pI < 7.0$), moderadamente básicas ($7.0 > pI < 9.0$) o fuertemente básicas ($pI > 9.0$) (Ros Barceló y cols. 1997, Ros Barceló y Pomar 2001, Quiroga y cols. 2000). Estos distintos grupos muestran una diferente localización subcelular pero una especificidad de sustrato similar. Estas semejanzas en las características bioquímicas mostradas por las peroxidasas, junto con el elevado grado de polimorfismo, es uno de los factores que más desconcierta a la mayoría de los investigadores que estudian las funciones metabólicas de estas enzimas.

Las plantas superiores codifican normalmente de 8 a 15 familias génicas de la peroxidasa, algunas de las cuales contienen dos o tres genes muy similares (Welinder 1992). En rábano se han secuenciado nueve genes distintos que comparten entre el 50-95 % de homología. Sin embargo, la resolución de isoenzimas de la peroxidasa de rábano por isoelectroenfoque revela la existencia de 42 isoenzimas (Hoyle 1977). Esto indica que más de una de las posibles isoenzimas determinadas por isoelectroenfoque pueden originarse a partir de un mismo gen, de modo que su origen debe radicar en los diferentes patrones de glicosilación resultantes de las modificaciones post-transcripcionales (Green y Oliver 1991). Otra fuente de polimorfismo y heterogeneidad puede provenir de las modificaciones covalentes o alteraciones conformacionales, incluyendo alteraciones alostéricas con componentes de bajo peso molecular, por ejemplo los fenoles presentes en la célula vegetal (Ros Barceló y cols. 1987). Estas interacciones también pueden modificar sus propiedades catalíticas (Ros Barceló y Muñoz 1989), ampliando así su papel metabólico.

Los 73 genes de peroxidasas de la clase III descubiertos en *Arabidopsis thaliana* se han utilizado para establecer las diferentes relaciones evolutivas de las peroxidasas en el reino vegetal (Duroux y Welinder 2003). Estos 73 genes se han agrupado en grupos similares y se han hecho estudios comparativos en dicotiledóneas, monocotiledóneas y otros grupos principales de plantas terrestres y algas, estableciendo que las peroxidasas de la clase III aparecieron en el momento en el que las plantas colonizaron la tierra.

V.3. Localización tisular y subcelular

Probablemente, para compensar su amplia especificidad de sustrato, la peroxidasa es una enzima que presenta una compartimentalización tisular muy específica. Así la peroxidasa está localizada en los tejidos meristemáticos (Crevecoeur y cols. 1997), en las células epidérmicas (Goldberg y cols. 1987, Hendriks y van Loon 1990, Ferrer y Ros Barceló 1994a) y vasculares (Czaninski y Catesson 1969, Ros Barceló y cols. 2002a). En las células vasculares, la peroxidasa puede estar localizada

en el xilema (Ferrer y Ros Barceló 1994b) y, secundariamente, en las células del cambium y del floema. En los frutos, la peroxidasa está fundamentalmente localizada en las células epidérmicas y del xilema (Calderón y cols. 1993); y en las hojas, la peroxidasa también está compartimentalizada en las células del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló 1997).

En todos estos tejidos, la peroxidasa se encuentra localizada tanto en las paredes celulares como en las vacuolas. Sin embargo, en las células meristemáticas (Crevecoeur y cols. 1997), cambiales (Ros Barceló y cols. 1991) y del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló 1997), las peroxidasas están principalmente localizadas en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur y cols. 1997) o bien firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló y cols. 1991, Sottomayor y Ros Barceló 1997). Esta situación es ligeramente diferente en las células epidérmicas y del xilema, donde la peroxidasa está localizada principalmente en las paredes celulares, tanto en las paredes celulares primarias (Goldberg y cols. 1987), fundamentalmente a nivel de las esquinas celulares y la lámina media, como en los engrosamientos secundarios (Ros Barceló 1995, Ros Barceló y cols. 2002a); siendo las pectinas uno de los factores que contribuyen a la distribución específica de las diferentes isoenzimas de la peroxidasa en los diferentes dominios de la pared celular (Ros Barceló y cols. 1988).

Estas particularidades también conciernen a la compartimentalización de las isoenzimas de la peroxidasa. De hecho, es de resaltar que, mientras que el espectro completo de peroxidasas (ácidas y básicas) se localiza en las paredes celulares, en las vacuolas sólo hay peroxidasas fuertemente básicas (Pedreño y cols. 1993). Esto indica que en la biosíntesis y recambio de los metabolitos secundarios como los fenoles y los alcaloides, que se compartimentalizan principalmente en la vacuola, están implicadas sólo las peroxidasas básicas (Pedreño y cols. 1993, Ros Barceló y cols. 1997), mientras que en la biosíntesis de las ligninas y los entrecruzamientos de la extensina y de los grupos feruloilo de las pectinas (reacciones que tienen lugar en las paredes de la célula vegetal) están implicadas los dos tipos de peroxidasas.

V.4. Especificidad de sustrato

El papel que desempeñan las peroxidasas en la polimerización de los alcoholes cinamílicos se ha descrito desde numerosas aproximaciones experimentales. Así, en tejidos lignificantes de tabaco (Lagrimini y cols. 1987), tomate (Mohan y cols. 1993) y de *Populus kitakamiensis* (Osakabe y cols. 1994) se expresan tanto los promotores del gen de la peroxidasa como una acumulación de sus transcritos.

Tanto las peroxidasas ácidas como las básicas son capaces de oxidar a los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico. Sin embargo, este hecho no está tan claro en el caso del alcohol sinapílico, que no es sustrato de muchas peroxidasas ácidas (Ros Barceló y cols. 1987; Dean y Eriksson 1994, Tsutsumi y cols. 1994, Takahama 1995, Bernards y cols. 1999). Estos resultados sugieren que, aunque las reacciones catalizadas por la peroxidasa están conducidas por fuerzas termodinámicas redox, la acomodación del sustrato en el centro catalítico de la enzima determina el papel real

que juega cada isoenzima de la peroxidasa en la biosíntesis de ligninas. Así, y aunque ocasionalmente se ha observado que algunas peroxidasas ácidas son capaces de oxidar residuos siringilo, tales como los presentes en la siringaldazina (Quiroga y cols. 2000, Christensen y cols. 2001), parece claro, por estudios de cristalografía de rayos X, que la oxidación del alcohol sinapílico por ciertas peroxidasas ácidas está dificultada estéricamente debido a interacciones hidrofóbicas desfavorables entre los átomos metoxi del alcohol sinapílico y los residuos conservados I-138 y P-139 en el sitio de unión al sustrato (Østergaard y cols. 2000) de la enzima. Este solapamiento aparentemente no ocurre en el sitio de unión al sustrato de las peroxidasas ácidas que oxidan a la siringaldazina (Christensen y cols. 2001), y por supuesto, tampoco ocurre en la mayoría de las peroxidasas básicas, donde el residuo I-138 está sustituido por el residuo L-138. Aunque no está claro si este es el único factor que condiciona la preferencia de sustrato de las peroxidasas básicas, la capacidad de estas enzimas para oxidar residuos siringilo está universalmente aceptada (Tsutsumusi y cols. 1994, Bernards y cols. 1999, Quiroga y cols. 2000, Ros Barceló y cols. 2000, Ros Barceló y Pomar 2001, Aoyama y cols. 2002), lo cual explicaría por qué la supresión antisentido de las peroxidasas básicas en plantas transgénicas disminuye tanto los niveles de unidades G como de S (Blee y cols. 2003), mientras que la supresión antisentido de ciertas peroxidasas ácidas sólo produce la disminución de los niveles de unidades G (Li y cols. 2003).

V.5. Papel fisiológico en la lignificación

Aunque en un principio puede considerarse que las peroxidasas son las candidatas más adecuadas para realizar el proceso de polimerización de los alcoholes cinamílicos, diversos estudios realizados con plantas transgénicas de tabaco muestran que una reducción significativa en la expresión de una isoenzima ácida de la peroxidasa no viene acompañada de una reducción de la lignificación (Lagrimini 1991), y arrojan ciertas dudas sobre la participación exclusiva de las peroxidasas ácidas en este proceso.

Otro aspecto que deberían cumplir las enzimas que participasen en la polimerización de los alcoholes cinamílicos es la de presentar una correlación cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidasas, esta correlación ha sido frecuentemente descrita en el endocarpo de melocotón (Abeles y Biles 1991), en fibras de lino (McDougall 1992), en álamo (Baier y cols. 1993), en agujas de píceas noruegas (Polle y cols. 1994) y en células en suspensión de *Zinnia elegans* durante la diferenciación en traqueidas (Sato y cols. 1995a). Sin embargo, en ninguno de los casos anteriormente citados ha sido una sola peroxidasa, ya sea básica o ácida, la única implicada en esas correlaciones. De todos estos estudios se desprende la conclusión de que más de una isoenzima parece estar implicada en la polimerización de los alcoholes cinamílicos. Estos estudios podrían explicar por qué la reducción en la expresión de una isoenzima de peroxidasa individual no está acompañada por una reducción en la lignificación de la pared celular.

Este hecho, más que una desventaja, podría ser una ventaja ya que la aparente redundancia en la función biológica mostrada por las isoenzimas de la peroxidasa podría ser la causa de la heterogeneidad mostrada por las ligninas dentro de las diferentes áreas de la pared celular (Ros Barceló 1997).

Las distintas isoenzimas de la peroxidasa pueden mostrar una cierta especificidad de sustrato y fuertes diferencias en su reactividad con los alcoholes cinamílicos. Cuando se estudian las afinidades de varias peroxidasas básicas aisladas de tejidos lignificantes por los alcoholes cinamílicos, se observan valores de k_M del orden de 10-400 μM (Takahama 1993, Ros Barceló 1998b). Estos valores de k_M , mostrados por las peroxidasas, son menores que los mostrados por las lacasas vegetales (12 mM) (Bao y cols. 1993), y se encuentran dentro del orden (5-500 μM) de los valores de afinidad mostrados por las enzimas precedentes en la ruta biosintética (Grisebach 1981, Dharmawardhana y cols. 1995). En este punto, no se debe olvidar que los valores de k_M de las peroxidasas con respecto al alcohol coniferílico presentan una cierta dependencia de la concentración de H_2O_2 , siendo proporcionalmente menor al descender la concentración de H_2O_2 (Ros Barceló 1998b). De hecho, los valores de k_M mostrados para el H_2O_2 por muchas peroxidasas, cuando se usan concentraciones de alcohol coniferílico entre 30 y 160 μM (Takahama 1993, Ros Barceló 1998b), sugieren que dichas enzimas se encuentran muy bien adaptadas a trabajar en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 .

Debido a la necesidad que tienen las peroxidasas del H_2O_2 para su actuación, es lógico pensar que para que las peroxidasas tuvieran un papel activo en la lignificación de la pared celular, no sólo es indispensable que éstas se encuentren localizadas en las mismas áreas de la pared celular que lignifica, sino que también es necesario que en ellas, las peroxidasas permanezcan activas. Por ello, es conveniente, aunque no indispensable (Ferrer y cols. 1990), que dichas áreas de la pared celular muestren una producción de H_2O_2 con el fin de favorecer la actividad de las peroxidasas.

V.6. La peroxidasa básica de *Zinnia elegans*

Los tallos y los hipocotilos de *Zinnia elegans* expresan la misma isoenzima básica de peroxidasa (López-Serrano y cols. 2004). Esta isoenzima de peroxidasa es capaz de oxidar tanto los alcoholes coniferílico y sinapílico, como el coniferilaldehído y el sinapilaldehído. Además, la versatilidad de esta enzima es tal que la preferencia de sustrato cubre los tres *p*-hidroxibenzaldehídos y los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos (Ros Barceló y cols. 2003). Sin embargo, los ácidos *p*-hidroxibenzoicos son peores sustratos de la enzima y su capacidad para oxidarlos se encuentra restringida al ácido siríngico.

La afinidad de esta peroxidasa de naturaleza fuertemente básica por los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos, y sus correspondientes aldehídos, es similar (Ros Barceló y Pomar 2001) a la mostrada por las enzimas precedentes de la ruta de biosíntesis de las ligninas (la Cald5H y la CAD), que también usan los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos y sus correspondientes aldehídos como sustratos. Estos resultados

indican que la ruta de biosíntesis de las ligninas no presenta sumideros metabólicos en los que los sustratos puedan acumularse, como se desprende de los flujos metabólicos en las células lignificantes (Anterola y cols. 1999). Todo esto sugiere que esta peroxidasa juega un papel clave en la lignificación de la pared celular, lo cual está apoyado por su localización en el xilema (Ros Barceló y cols. 2000 y 2002b, López-Serrano y cols. 2004). En este punto, cabe mencionar que la versatilidad que presentan ciertas enzimas es una de las fuerzas motrices de la evolución de las plantas terrestres, y hoy día existe un consenso general (Boerjan y cols. 2003) de que las peroxidasas confieren una elevada plasticidad metabólica a la ruta biosintética de las ligninas. En el caso de esta peroxidasa básica, el significado real de su versatilidad parece ser el siguiente: la existencia en plantas de esta peroxidasa capaz de catalizar con alta afinidad y elevada actividad catalítica la polimerización de los tres alcoholes *p*-hidroxicinámilicos y de los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos, y sus correspondientes derivados, hace que la heterogeneidad de los precursores de las ligninas no sea prohibitiva, ni suponga un elevado coste metabólico para la planta. De hecho, la versatilidad (plasticidad metabólica) de esta peroxidasa básica confiere un cierto sentido a la heterogeneidad de la ruta de biosíntesis de las ligninas. El hecho de que la proteína se exprese en hipocotilos, tallos y cultivos celulares de *Zinnia elegans* (Gabaldón y cols. 2005) sugiere que esta proteína no sólo cumple todos los requerimientos catalíticos para estar implicada en la lignificación superando todas las restricciones impuestas por el paso de polimerización, sino que también su expresión es inherente a la lignificación. La naturaleza de su punto isoelectrico (pI) básico no es algo excepcional, ya que las peroxidasas básicas se expresan diferencialmente durante la lignificación en otros sistemas modelo (Quiroga y cols. 2000, Holm y cols. 2003), mostrando propiedades bioquímicas inusuales y únicas como la oxidación de los residuos siringilo (Aoyama y cols. 2002).

VI. Ligninas y evolución

VI.1. Evolución de los tejidos vasculares y de sostén de las plantas

La necesidad de agua de la planta está determinada por la tasa de transpiración que se produce en el intercambio gaseoso. Los requerimientos de agua para fotosíntesis y crecimiento son, en comparación, de menor importancia.

El uso eficiente del agua para la fotosíntesis en las plantas terrestres pudo haber sufrido fluctuaciones y las plantas pudieron controlar su uso eficiente del agua, hasta cierto punto, por ajustes en la temperatura foliar y la capacidad fotosintética (Lambers y cols. 1998) de tal forma que el rango de cambios fisiológicos pudo estar dictado por las concentraciones de CO₂ atmosférico.

La colonización de la tierra y el origen de los más importantes clados durante el inicio del Carbonífero fueron facilitados por niveles muy altos de CO₂ atmosférico (Sperry 2003).

Estas condiciones pudieron haber favorecido a sistemas con relativamente baja conductancia hidráulica y con, al mismo tiempo, alta capacitancia (capacidad para almacenar agua), una combinación fortuita que facilitó el origen de plantas no vasculares y de las primeras plantas vasculares con capacidad de transporte necesariamente limitadas y con buena capacitancia por las delgadas y elásticas paredes celulares del tejido parenquimático (Sperry 2003).

La evolución del sistema de transporte de agua tuvo que ser muy eficiente para evitar la privación de la planta (Figura 1.23). La inversión de la planta en tejido vascular fue mínima porque el agua fluye a través de tubos de alta conductancia, de células muertas, con mínimo coste de mantenimiento. El coste de la transpiración fue reducido a la presión del flujo negativo inducido por el apoplasto ("estrés dinámico del agua"), la construcción de una red de conducción y las pocas capas de tejido vivo, entre los conductos y el suelo, que filtran el agua (Sperry 2003).

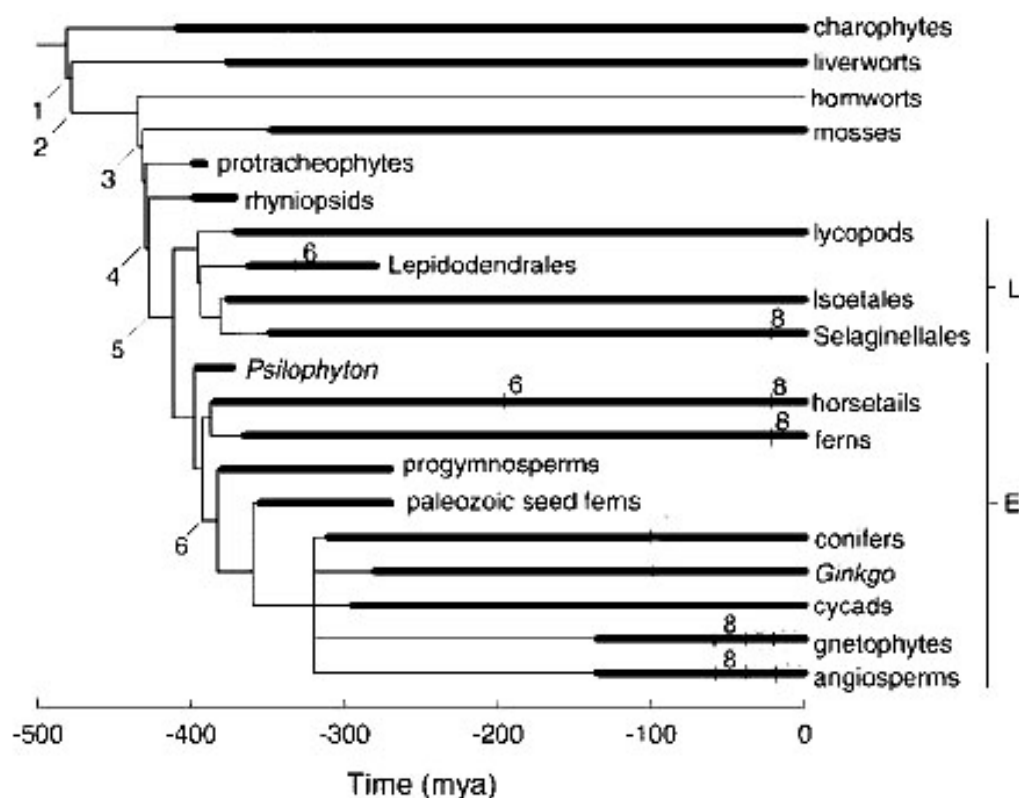


Figura 1.23. Eventos en la historia de las plantas. La filogenia muestra hipotéticas relaciones entre plantas actuales y fósiles (Kenrick y Crane 1997, Doyle 1998, Judd y cols. 2002). Las líneas gruesas indican la presencia en el registro fósil. (L) licófitos, (E) eufilófitos. Los números indican el momento en el que se produjeron los principales eventos evolutivos (1: cutícula, 2: estoma, 3: hidroides, 4: traqueidas bandeadas, 5: traqueidas punteadas, 6: leño, 7: endodermis, 8: vasos). Existen grandes dudas sobre la determinación del momento preciso en el que apareció la endodermis, por lo que, en la figura no aparece situado el número 7. Modificado de Sperry 2003.

Con toda probabilidad, la evolución del mecanismo de cohesión-tensión fue inevitable y directa. Los ingredientes básicos podrían haber estado presentes en los descendientes de las algas verdes que habrían encallado sobre la tierra (Sperry 2003).

Las primeras plantas terrestres, por analogía con sus parientes no vasculares vivos, probablemente evitaron el excesivo estrés siendo pequeñas, para evitar la caída de presión, y teniendo cutícula (con o sin poros) sobre una superficie fotosintética para mantener la transpiración dentro de los límites de su capacidad de transporte. Junto con las esporas, los restos de cutícula son las primeras evidencias fósiles de plantas terrestres (Sperry 2003).

Esas primeras plantas terrestres fueron necesariamente "poiquilohídricas", equilibrando su potencial hídrico con fuentes de agua muy próximas (Raven 1987) y dependiendo de su capacidad de almacenamiento de agua para prolongar los períodos de hidratación. La tolerancia a la desecación, tan común en los modernos briófitos y algas verdes terrestres es, indudablemente, una estrategia ancestral esencial de supervivencia en la tierra en ausencia de un sistema especializado de aporte de agua (Oliver 1996).

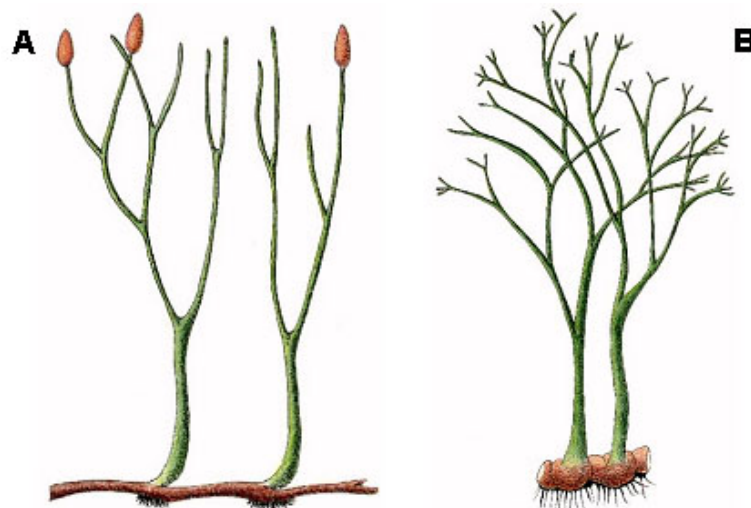


Figura 1.24. Protraqueófitos extinguidos que tenían delgados y sencillos conductos con paredes perforadas, como los hidroides de los musgos actuales. (A) *Aglaophyton* y (B) *Horneophyton*.

La inevitable capilaridad en plantas no vasculares condujo, en un paso poco conceptual, hacia las plantas vasculares con conducción de agua por medio de esqueletos de células muertas. La alta conductividad por unidad de superficie proporciona cuatro ventajas: (1) menor inversión en transporte de agua, particularmente porque los conductos muertos no requieren mantenimiento, (2) potencial para mayores rutas y, así, plantas de mayor tamaño, (3) menor estrés dinámico, y (4) altas tasas de difusión de CO₂ (Sperry 2003).

Esas innovaciones fueron acompañadas inicialmente con inequívocas células conductoras de agua, presentes en el registro fósil desde hace 410 millones de años. Un amplio rango de morfologías de estos conductos estuvo presente durante 390 millones de años (Sperry 2003).

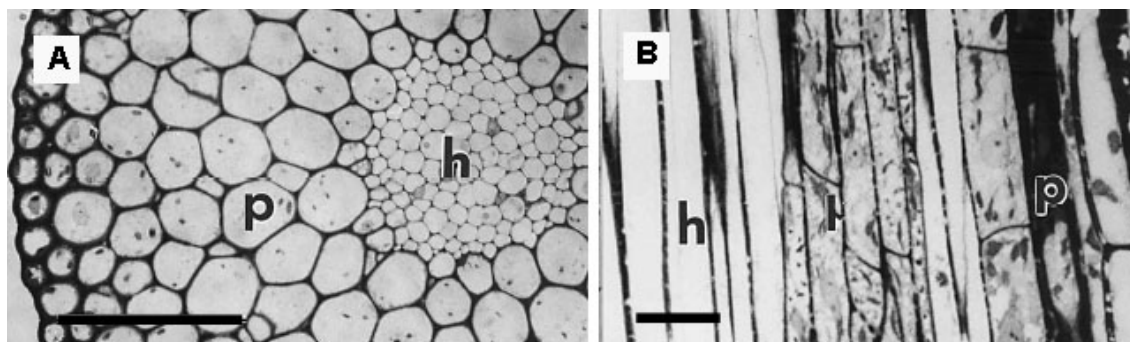


Figura 1.25. Hidroides de musgos. (A) *Plagionium undulatum*, sección transversal. (B) *Polytricum commune*, sección longitudinal. Barra en A = 50 μm . Barra en B = 10 μm . h, hidroides. l, leptoides y p, parénquima. De Ligrone y cols. 2000.

Estos conductos sencillos eran de pequeño calibre, con débiles paredes perforadas como los que aparecían en los, ahora extinguidos, protraqueófitos (*Aglaophyton*, *Horneophyton*) (Kenrick y Crane 1991) (Figura 1.24). Estos sistemas, recuerdan a los hidroides (Figura 1.25) de algunos musgos actuales y pueden tener un ancestro común (Mishler y Churchill 1984, Kenrick y Crane 1997). Esos tubos fósiles no parecen haber estado lignificados pero pudieron haber sido impregnados con polifenoles relacionados con las ligninas, como también sucede en los actuales hidroides. Los modernos hidroides tienen una rigidez limitada, como evidencia su tendencia al colapso (Ligrone y cols. 2000).

Las traqueidas han sido definidas como conductos simples con paredes ornamentadas y lignificadas, bandeadas o perforadas (Kenrick y Crane 1997, Doyle 1998). Pudieron haber evolucionado una vez para dar lugar a los traqueófitos. El tipo bandeado recuerda superficialmente las traqueidas del moderno protoxilema (Kenrick y Crane 1991).

Las paredes secundarias lignificadas de los elementos traqueales proporcionaron un significativo incremento en la fuerza compresiva (Niklas 1992). Sostener elementos traqueales fue probablemente la función original de la lignina y las paredes secundarias en las plantas (Raven 1987).

Las engrosadas y presumiblemente lignificadas paredes celulares de las plantas vasculares del principio del Devónico estaban limitadas a los elementos traqueales de una protoestela - un cordón cilíndrico en el centro del tallo -. Esta posición no indica un papel en el soporte mecánico porque las fuerzas comprensivas del tallo curvado son grandes en la epidermis. Esas plantas fueron pequeñas y capaces hidrostáticamente (Vincent y Jeronimidis 1991, Niklas 1994). Un cordón central de tejido lignificado no podría ser una barrera para herbívoros, aunque los componentes de la lignina pueden haber evolucionado previamente como defensa química (Raven 1987).

Las ligninas dan rigidez a la pared celular en parte reemplazando al agua de la matriz de la pared celular y de los poros (Donaldson 2001). La evolución de las plantas de poiquilohídricas (con gran variación en su contenido hídrico) a homeohídricas (con capacidad para controlar el contenido de agua) fue asociada con el descenso de la tolerancia a la desecación de las células vegetativas, aunque esta ancestral

característica fue retenida en las semillas, el polen y las esporas de algunas plantas vasculares (Oliver 1996).

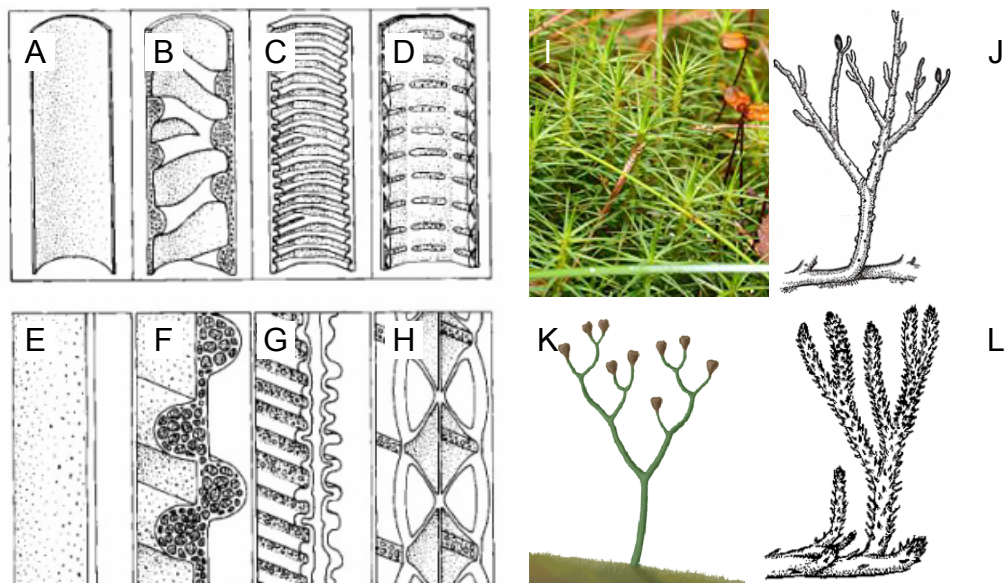


Figura 1.26. Morfología de los conductos de agua en las primeras plantas fósiles (arriba) y detalles de la estructura de la pared (abajo). (A y E) Hidroides, conductos típicos de algunos musgos, (B y F) engrosamientos bandeados en una traqueida tipo S en *Rhynia*, (C y G) engrosamientos bandeados en una traqueida tipo G, típica de traqueófitos extintos y (D y H) engrosamientos bandeados de una traqueida tipo P, propia de eufilófitos. (I) Musgo: *Polytrichum commune*, (J) *Rhynia*, (K) Eutraqueófito extinto: *Drepanophycus* y (L) Trimerófito: *Cooksonia*. Modificado de Kenrick y Crane 1997.

La explosión de tamaño de las grandes plantas requirió una serie de cambios de tipo hidrostático en los tallos favorecidos por las lignificadas y engrosadas paredes celulares (Niklas 1990, Niklas 1994) (Figura 1.26). La transición de soporte hidrostático a soporte de la pared celular de crecimiento primario fue debido probablemente a la evolución del esclerénquima localizado en la periferia del tallo (Raven 1987, Speck y Vogellehner 1988).

La localización central del tejido vascular en las primeras plantas vasculares pudo haber sido necesaria para protegerlas del estrés provocado por la curvatura. En patrones estelares más complejos donde los tejidos vasculares están dispersos, los elementos traqueales están embebidos en fibras del esclerénquimas que no son conductoras y que liberan a los primeros del estrés mecánico (Vincent y Jeronimidis 1991). Este modelo se extiende hasta los vasos de angiospermas embebidos en fibras que los soportan.

La vulnerabilidad mecánica de los elementos traqueales identifica un intercambio básico de sus funciones. La combinación de soporte y transporte en las traqueidas del xilema secundario normal ancestral, de progimnospermas y plantas con semillas, representa una condición adquirida que puede minimizar el intercambio, quizás vía evolución de más sofisticados conductos que minimizaron el descenso de fuerza mecánica por un aumento de permeabilidad al agua (Beck y cols. 1982).

Los elementos traqueales de las primeras plantas vasculares fósiles y sus parientes vivos parecen tener la mayor concentración de lignina adyacente al lumen celular (Friedman y Cook 2000). Esta situación se invierte en las plantas superiores, en las que la mayor concentración de lignina está en la lámina media alcanzando valores mucho menores en el lumen (Donaldson 2001). El modelo de lignificación podría tener importantes aplicaciones funcionales.

La membrana perforada de las plantas actuales es homóloga a la región no lignificada de la pared primaria situada entre los engrosamientos del protoxilema (Mauseth 1988). Empleando un argumento ontogénico, Kenrick y Crane (1997) sugirieron que las traqueidas perforadas del metaxilema evolucionaron de las traqueidas bandeadas de un protoxilema tipo que está exclusivamente presente en rinópsidos, con la forma ancestral persistiendo en el protoxilema.

Las traqueidas bandeadas de tipo G parecen una mejora de las de tipo S por la localización de grandes poros (Kenrick y Crane 1991) sobre delgadas áreas y el alineamiento de esas zonas entre traqueidas adyacentes (Figura 1.27).

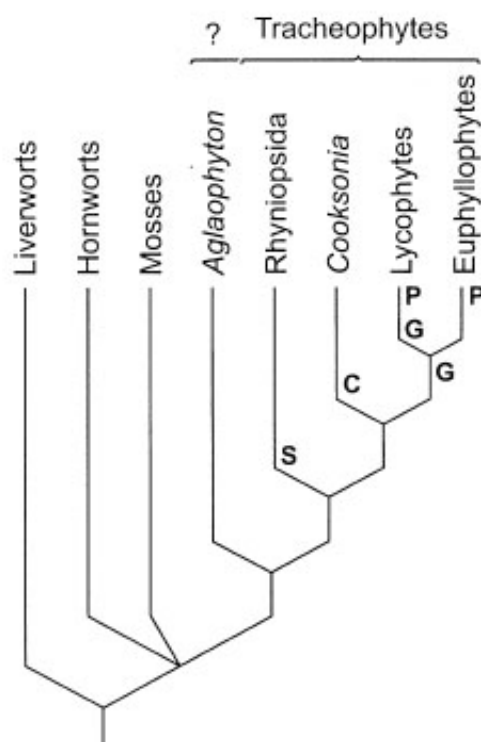


Figura 1.27. Revisión de las relaciones filogenéticas entre embriófitos. P, G, C y S son los tipos de traqueidas. De Friedman y Cook (2000).

Las primeras traqueidas perforadas tienen bandas bordeadas escalariformes que recuerdan a las modernas traqueidas perforadas. La membrana de perforación, perfectamente definida, no está lignificada (y así es hidrofílica), lo que podría maximizar la permeabilidad. Perforaciones circulares bordeadas con membranas delgadas y homogéneas aparecen en progimnospermas del Devónico tardío (Beck y cols. 1982).

Las traqueidas con perforaciones sencillas son el único tipo de conducto del xilema presente en el registro fósil durante los primeros 140 millones de años de evolución vascular. En los primeros 40 millones de años, hacia el fin del Devónico, el diámetro de las traqueidas aumenta hasta su máximo actual, 80 μm (Niklas 1985). Durante el mismo período, la superficie total de traqueida por superficie de tejido se incrementa en asociación con la más compleja anatomía estelar (Niklas 1984, Roth-Nebelsick y cols. 2000). El incremento de vascularización tuvo lugar conjuntamente con la evolución de las hojas (Niklas 1984, Knol y Niklas 1987).

El tamaño en longitud y anchura de las traqueidas ha ido evolucionando conjuntamente hasta alcanzar una longitud máxima de 10 mm (Schweingruber 1990). Posteriores incrementos de longitud y diámetro pueden ser imposibles por los límites establecidos por el volumen celular máximo (Lancashire y Ennos 2002). Esta limitación fue superada con la aparición de los vasos.

Los vasos pueden alcanzar mayor tamaño que las traqueidas, diámetros máximos de 500 μm y longitudes mayores de 10 m (Zimmermann 1983). Los vasos no están condicionados por el máximo de volumen celular como las traqueidas. Mientras que los elementos de los vasos son cortos, como se espera del límite establecido para el volumen, no hay límite para el número de elementos presentes en los vasos (Ennos 2002).

Los primeros elementos vasales fósiles fueron de Gigantopteridales, orden del Pérmico tardío. Son muy similares a los vasos de los modernos gnetófitos y han evolucionado de las traqueidas con perforaciones bordeadas (Li y cols. 1996). Los primeros vasos de angiospermas no aparecen hasta la mitad del Cretácico. Sus placas de perforación escalariformes pueden indicar que los vasos de angiospermas han evolucionado de traqueidas con punteaduras escalariformes, como aparecen en los, presumiblemente, vasos ancestrales de angiospermas (Baas y Wheeler 1996, Feild y cols. 2002).

El origen de un nuevo tipo de xilema conductor puede haber sido provocado por las variaciones en la concentración de CO_2 durante la última parte del Carbonífero y la primera del Pérmico. Desde el punto de vista del desarrollo y de la fisiología, el cambio de la producción de traqueidas a la producción de fibras y elementos vasales pudo ser muy simple, requiriendo simplemente auxinas y giberelinas durante la diferenciación (Aloni y cols. 2000).

Con la excepción de las traqueidas tipo G en licófitos y un trimerófito con traqueidas tipo P, las descritas anteriormente están agregadas en una columna central que es cilíndrica o elíptica en sección transversal. La mayoría están compuestas enteramente por traqueidas; raramente son medulados o tienen desparramado el parénquima en rizomas (*Nothia*). Algunos cambios en el contorno son asociados con la ramificación (*Psilophyton dawsonii*, *Gosslingia breconensis*) y con trazas esporangiales (*Nothia*). Licófitos del principio del Devónico poseen protostelas profundamente lobuladas (actinostelas, por ejemplo en *Drepanophycus* y *Baragwanathia*) y trimerófito ramificado, anónimo pero complejo y de regular tamaño, que tiene un xilema profundamente trilobado, con varios grupos de protoxilema

(Gensel 1979). En formas protostélicas, en *Rhynia*, hay una zona de tejido parenquimatoso diferenciado rodeando completamente al xilema, es el floema. No han sido encontradas áreas cribosas (Satterthwait y Schopf 1972, Edwards 1993). Xilema y floema carecen de espacios aéreos y no aparece endodermis.

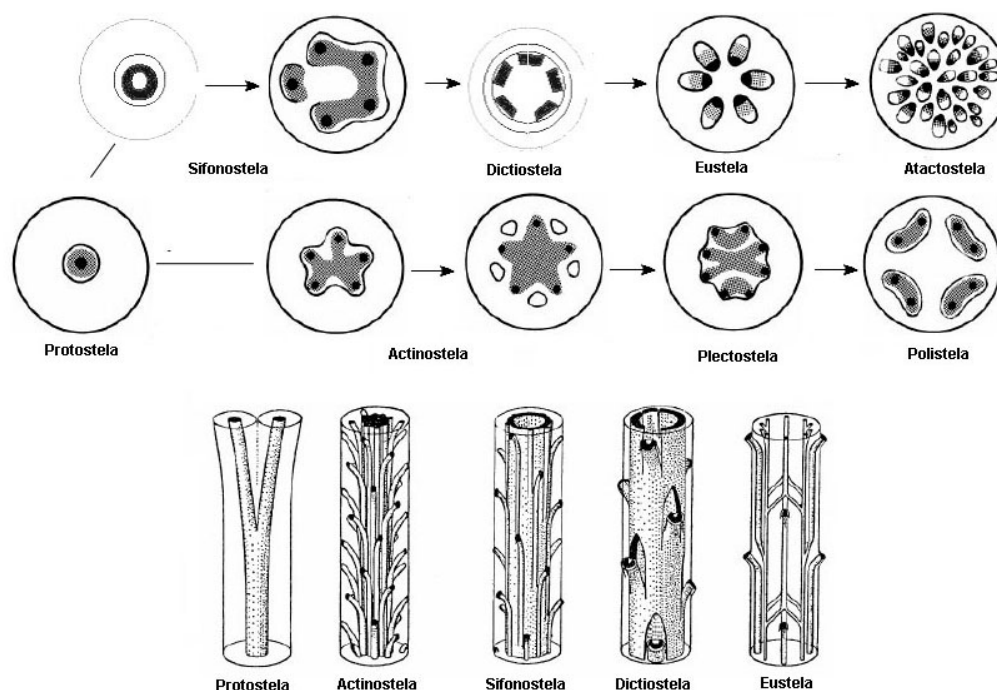


Figura 1.28. Teoría estélica. Modelo de evolución del sistema vascular de las plantas.

El significado fisiológico de esos aspectos ha sido discutido por Raven (1984). Niklas (1985) examinó las variaciones en los volúmenes relativos del xilema y los ejes durante el Devónico y revisó la hipótesis del incremento de volumen del xilema por incremento de la superficie del xilema en contacto con los tejidos vivos que lo rodean. Morfológicamente esto es por los cambios de una protostela cilíndrica a una actinostela y a varias clases de xilema. Otros trabajos de Roth, Mossbruger y Neugebauer (1994), y Raven (1994) discuten sobre la desventaja de la protostela en minimizar las distancias que el agua y los metabolitos recorren, de y hacia los sitios de fotosíntesis. En contraste, Wight (1987) y Stein (1993) concluyeron que la forma del xilema está relacionado con el número y tipo de apéndices laterales (Figura 1.28).

VI.2. Las ligninas en las plantas actuales

Aunque investigadores rusos han mantenido con insistencia que las algas pardas *Cystoseira barbata* Good y Wood (Dovgan y Medvedeva 1983a y 1983b) y *Fucus vesiculosus* L. (Rednicov y cols. 1978) contienen ligninas en cantidades superiores al 20% de su peso seco, la identificación dependió únicamente de la comparación de sus tiempos de retención cromatográficos con los de los auténticos estándares fenilpropanoides. Posteriores trabajos para comprobar estos resultados

(Ragan 1984, Ragan y Glombitza 1986) no han aportado evidencias de la presencia de estructuras fenilpropanoides derivadas de la lignina. Sin embargo si revelaron la presencia de polímeros derivados del floroglucinol.

Una situación similar podría ser referida a las algas verdes. Aunque se ha publicado que *Coleochaete*, una clorofícea, contiene ligninas o derivados de las ligninas al producir fluorescencia bajo luz UV y dar positivo el test de Mäule (Delwiche y cols. 1989), se piensa que es preciso encontrar evidencias más sólidas para que las algas verdes puedan ser incluidas entre las plantas sintetizadoras de ligninas.

La evidencia de ligninas en musgos ha provocado controversia. Se ha descrito la presencia en *Sphagnum* de una sustancia fenólica compleja con espectro de absorción en UV correspondiente a las ligninas (Farmer, 1953). Sin embargo, la oxidación con nitrobenzeno produjo solo trazas de vanilina y siringaldehído (Kratzl y Eibl 1951, Lindberg y Theader 1952).

Los análisis realizados con otros géneros, *Dawsonia*, *Dendroligotrichum* y *Polytrichum* (Figura 1.29) presentaron resultados positivos para el test de Mäule (Siegel 1969). En el caso de *Dendroligotrichum* se observó que las ligninas, o sustancias relacionadas, fueron localizadas en paredes celulares de hidroides (células conductoras de agua).



Figura 1.29. Especies que presentaron resultados positivos para el test de Mäule. (A) *Dawsonia*, (B) *Dendroligotrichum* y (C) *Polytrichum*. (D) Proantocianidina.

Estudios posteriores llevaron a la conclusión de que no hay restos de ligninas en las paredes de los musgos y las sustancias encontradas podrían ser derivadas de polímeros de hidroxibenzofurano o proantocianidina. Aunque esas sustancias no son ligninas, en principio una parte de sus estructuras puede resultar de alguna rama de la ruta fenilpropanoide. Evidencias histoquímicas apuntan también a la presencia de compuestos polifenólicos (Scheirer 1980), esta presencia está también confirmada por estudios químicos (Miksche y Yasuda 1978). Por otra parte Logan y Thomas (1985) detectaron la presencia de derivados de las ligninas en hepáticas.

En licófitos pertenecientes a la familia Licopodiaceae se han encontrado productos de degradación de ligninas de tipo guaiacilo con pequeñas cantidades de *p*-hidroxibenzaldehído mientras que no aparecieron restos siringilo (Ibrahim y cols. 1962, Logan y Thomas 1985, Towers y Maass 1965, White y Towers 1967). Los estudios citados pueden ser considerados rudimentarios por la metodología empleada, aunque incluyen histoquímica y métodos de degradación química (por ejemplo, oxidación con hidróxido sódico/óxido cúprico y oxidación permanganato). *Isoetes* no tiene productos

indicativos de lignina (Erickson y Miksche 1974), en cambio, en representantes de la familia Sellaginellaceae se han encontrado predominantemente unidades siringilo, presentando ligninas de tipo guaiacilo-sinrigilo que, hasta el momento, se consideraban típicas de angiospermas (Towers y Gibbs 1953, Lewis 1980, Logan y Thomas 1985, Jin y cols. 2005 y 2007 y Gomez Ros y cols. 2007).

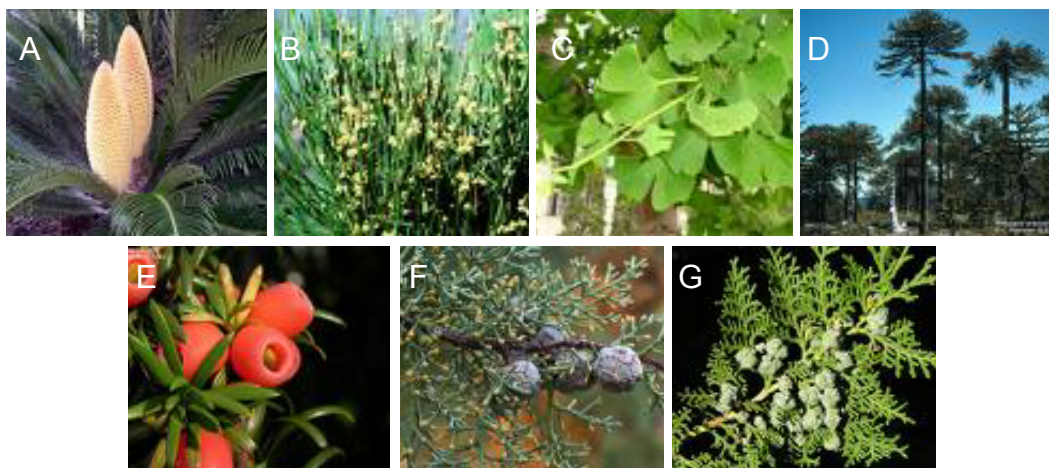


Figura 1.30. Gimnospermas que presentan ligninas. (A) *Cycas revoluta* Thunb, (B) *Ephedra viridis* Coville, (C) *Ginkgo biloba* L., (D) *Araucaria araucana* (Molina) Koch, (E) *Taxus baccata* L., (F) *Cupressus arizonica* Greene y (G) *Thuja orientalis* L.

En esfenópsidos de la familia Equisetaceae se han encontrado pequeñas cantidades de *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído (Ibrahim y cols. 1962, Logan y Thomas 1985, White y Towers 1967).

Los filicófitos de las familias Cyathaceae y Adiantaceae (Logan y Thomas 1985) tienen ligninas tipo guaiacilo con pequeñas proporciones de *p*-hidroxibenzaldehído, mientras que representantes de la familia Dennstaedtiaceae (Bohm y Tryon 1967) contienen componentes guaiacilo y siringilo. Estos resultados fueron obtenidos por oxidación con hidróxido sódico/óxido cúprico.

Las ligninas de gimnospermas han sido intensamente estudiadas debido a su importancia comercial. Son consideradas de tipo guaiacilo pero son muchas las excepciones a esta norma ya que se conocen varios casos de gimnospermas en las que predominan los grupos siringilo. Resultados recientes (Gomez-Ros y cols. 2007) lo confirman. *Araucaria* spp, *Cupressus* spp, *Cycas revoluta*, *Ginkgo biloba*, *Taxus baccata* y *Thuja orientalis* son ejemplos de gimnospermas que inequívocamente presentan ligninas tipo G, las propias de este grupo, mientras que *Ephedra viridis* presenta ligninas de tipo S, típicas de angiospermas (Gomez-Ros y cols. 2007) (Figura 1.30).

Como las gimnospermas, las angiospermas han sido analizadas con detalle, siendo descritas como de tipo guayacil-siringilo (Tabla 1.2). También en este grupo se han encontrado especies que tienen ligninas que carecen de grupos siringilo.

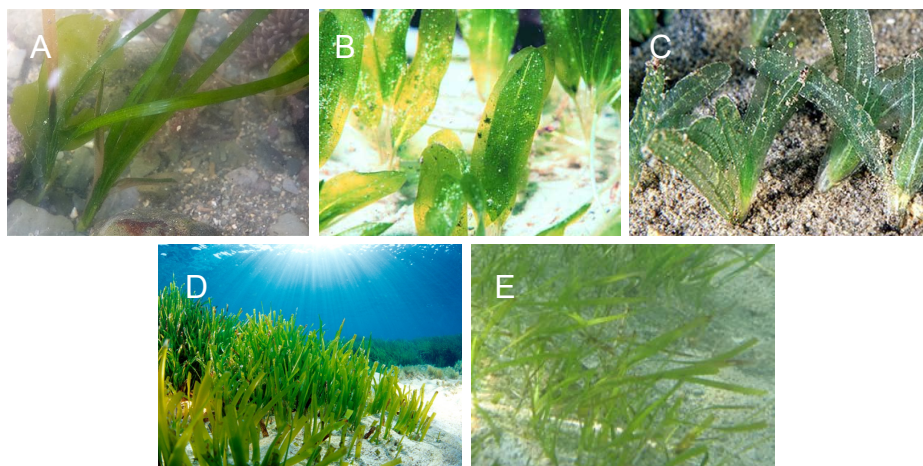


Figura 1.31. Angiospermas marinas que presentan ligninas. (A) *Zostera marina*, (B) *Halophila ovalis*, (C) *Halophila stipulacea*, (D) *Halodule uninervis* y (E) *Posidonia australis*.

También se han encontrado ligninas en las angiospermas marinas. Aunque con resultados contradictorios dependiendo de las técnicas de medida empleadas. *Zostera marina* L. (Godshalk y Wetzel 1978), *Halophila ovalis* (Br.) Hook, *Halophila stipulacea* Forsskal, y *Halodule uninervis* Boiss (Baydoun y Brett 1985) y *Posidonia australis* Hook (Kuo y Cambridg 1978) han dado resultados positivos a la presencia de ligninas (Figura 1.31).

Estudios más recientes (Klap y cols. 2000) han confirmado la presencia de ligninas en *Posidonia oceanica* (L.) Delile y *Zostera marina*.

Se asume frecuentemente (Peter y Neale 2004) que la complejidad química de las ligninas se ha incrementado durante el curso de la evolución vegetal, desde los antiguos pteridófitos y gimnospermas hasta las más evolucionadas herbáceas; sin embargo, al mismo tiempo, frecuentemente se olvida el hecho de que traqueófitos basales tales como el licófito *Selaginella* y el helecho acuático *Ceratopteris*, tienen ligninas compuestas de unidades G y unidades S (Gomez-Ros y cols. 2007a, Jin y cols. 2005). Esta observación está en concordancia con el hecho de que licopodios y helechos acuáticos, junto con angiospermas y gnetales, tienen vasos en el xilema (Schneider y Carlquist 2000, Carlquist y Scheider 2000b); así, la presencia de ligninas tipo S en traqueófitos basales puede estar más extendida de lo que inicialmente se pensó.

Las plantas vasculares con esporas exhiben un rango de modelos de lignificación: el licopodio *Selaginella* posee un complejo de la pared primaria fuertemente lignificado, como el de las coníferas. El pteridófito carente de hojas *Psilotum* desarrolla no lignificados complejos de la pared primaria como los de *Acer*, mientras que *Pteridium* representa un estado intermedio con todas las capas exhibiendo una ligera lignificación.

Tabla 1.2. Composición monomérica de las ligninas obtenida mediante oxidación con nitrobenzono (NBO) y tioacidólisis (TA) de las paredes celulares de angiospermas, gimnospermas y licopodios. tr: traza, nd: no determinado. ^a Resultados tomados de Gross 1980. De Gomez Ros 2007, Tesis doctoral.

Especies vegetales	H (%)		G (%)		S (%)	
	NBO	TA	NBO	TA	NBO	TA
<i>Zinnia elegans</i> (tallo)	22		56		22	
<i>Zinnia elegans</i> (hipocotilo)	0	1	41	47	59	52
<i>Capsicum annuum</i> L.	5,8	<1	60	68	33,8	31
<i>Populus alba</i> L.	2,4	1	77,5	44	20,1	55
<i>Ephedra viridis</i>	nd	2,5	nd	41	nd	56,5
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	6	3,6	94	96,4	0	0
<i>Pinus sylvestris</i> L.	2 ^a	nd	98 ^a	nd	tr ^a	nd
<i>Picea abies</i> (L.) Karsten	2 ^a	nd	97 ^a	nd	1 ^a	nd
<i>Araucaria araucana</i>	3 ^a	67	96 ^a	92	1 ^a	1
<i>Araucaria heterophylla</i>	nd	7	nd	90	nd	3
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	nd	11	nd	89	nd	0
<i>Tetraclinis articulata</i> (Vahl) Masters	6 (8 ^a)	nd	60 (61 ^a)	nd	34 (30 ^a)	nd
<i>Thuja orientalis</i>	nd	7	nd	93	nd	0
<i>Taxus baccata</i>	4 ^a	1,3	95 ^a	97,4	1 ^a	1,3
<i>Ginkgo biloba</i>	6 ^a	3	93 ^a	94	1 ^a	3
<i>Cycas revoluta</i>	1 ^a	4	98 ^a	95	1 ^a	1
<i>Selaginella martensii</i> Spring	22 ^a	3	34 ^a	27	44 ^a	70

En las plantas, tanto las que tienen esporas como las de flores, para las que la regulación hidráulica puede ser una posibilidad, las células conductoras de agua juegan solo un papel secundario en el soporte estructural. En esos taxa el soporte está proporcionado por las células del esclerénquima con paredes primarias lignificadas (Boyce y cols. 2004).

VII. Peroxidasas y evolución

VII.1. Filogenia de las peroxidasas

Qiu y Palmer (1999) son autores de una profunda revisión de datos de carácter morfológico y molecular (genoma, mitocondria y cloroplasto) procedentes de las algas verdes y de todos los grupos de plantas terrestres (Figura 1.32). En ella se concluye que:

- Evidencias moleculares y estructurales indican que los tradicionalmente definidos órdenes de carófitos son ciertamente linajes naturales, y juntos forman un grupo parafilético con las plantas terrestres. Los caracteres morfológicos y los estructurales del genoma cloroplástico y los datos de las secuencias rbcL señalan a

las Charales y a las Coleochaetales como los parientes más próximos a las plantas terrestres entre los cinco órdenes de carófitos.

- Virtualmente todos los datos apoyan la parafilia de los briófitos. Información estructural del genoma y al menos algunos datos de secuencias identifican a las hepáticas como las primeras plantas terrestres. Las relaciones entre musgos, antoceros y plantas vasculares aún no está resuelta. La monofilia de musgos y antoceros parece estar bien establecida pero no la de hepáticas.

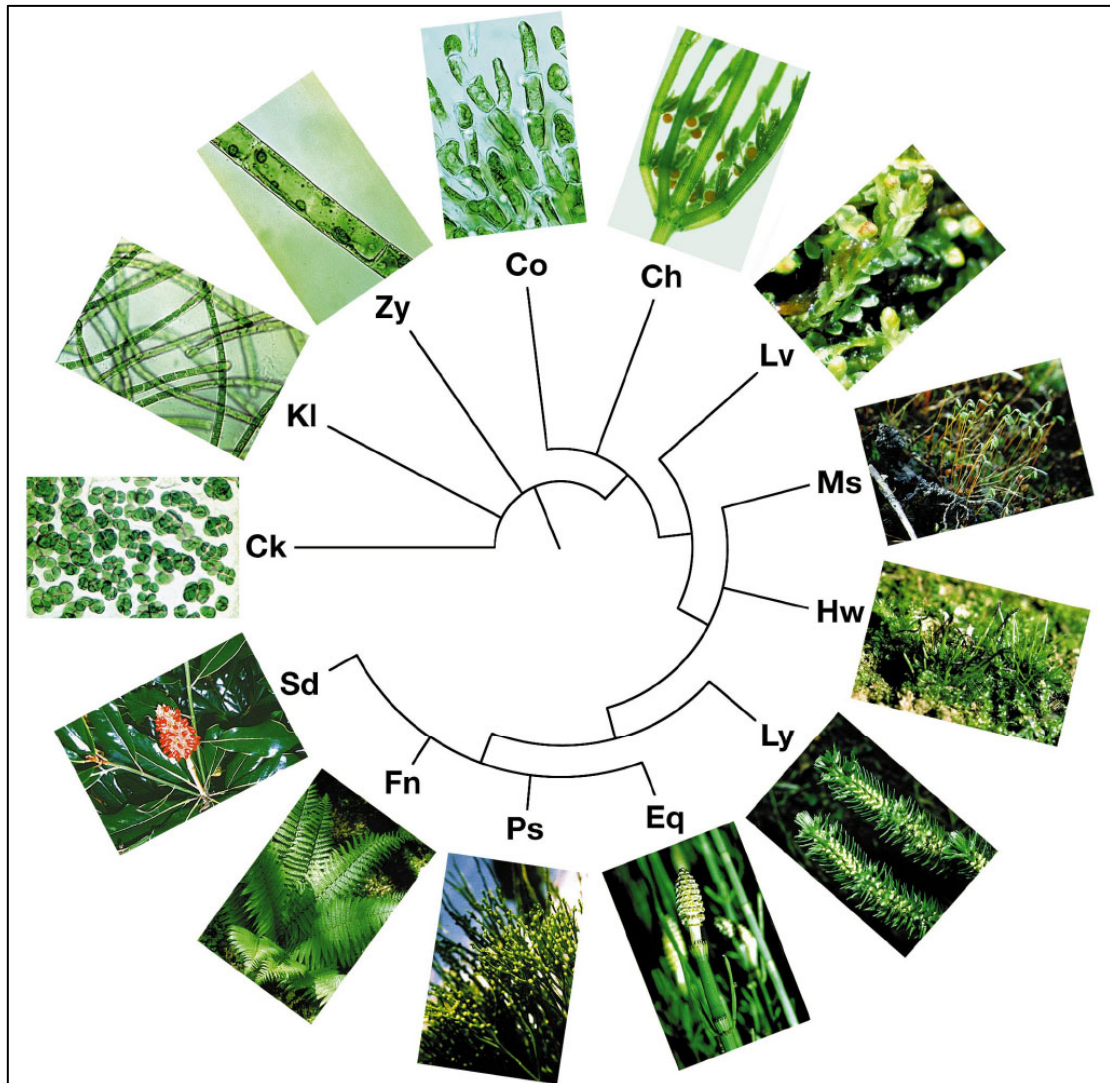


Figura 1.32. Actual percepción de las relaciones filogenéticas entre los linajes más importantes de carófitas y plantas terrestres. Las plantas mostradas son: Chlorokybales (Ck), Klebsormidiales (Kl), Zygnematales (Zy), Coleochaetales (Co), Charales (Ch), Hepáticas (Lv), Musgos (Ms), Antoceros (Hw), Licopodios (Ly), Equisetos (Eq), Psilotaceae (Ps), Helechos (Fn) y Plantas con semillas (Sd). Tomado de Qiu y Palmer 1999.

- Los datos de secuenciación confirman la monofilia de licopodios y de Psilotaceae, pero pone en cuestión seriamente la monofilia de los helechos con Psilotaceae colocado entre los helechos eusporangiados. De acuerdo con una inversión en el DNA cloroplástico, los licopodios son el primer linaje de las plantas vasculares, pero los datos de secuenciación han fracasado para confirmar este

aspecto. Las relaciones entre los helechos/Psilotaceae, *Equisetum* y las verdaderas plantas están aún sin resolver (Figura 1.32).

En la actualidad es posible construir árboles filogenéticos referidos a una secuencia de un gen o de varios genes que codifican para una determinada proteína. En nuestro caso sería de interés disponer del árbol filogenético de la peroxidasa para poder compararlo con el más general visto anteriormente.

El análisis por el método de "Mínima evolución" (Figura 1.33) sugiere que las peroxidasas tipo S constituyen una rama ancestral cuyo origen se remonta a ancestrales (no vasculares) linajes en el monofilético origen de las plantas terrestres (Qiu y Palmer, 1999). En este análisis (Figura 1.31), las peroxidasas de tipo G de *Arabidopsis thaliana* (Cruciferae) y de *Armoracia rusticana* Gaerthn, Mey y Scherb (Brassicaceae) aparecen como una rama más evolucionada entre las peroxidasas de clase III.

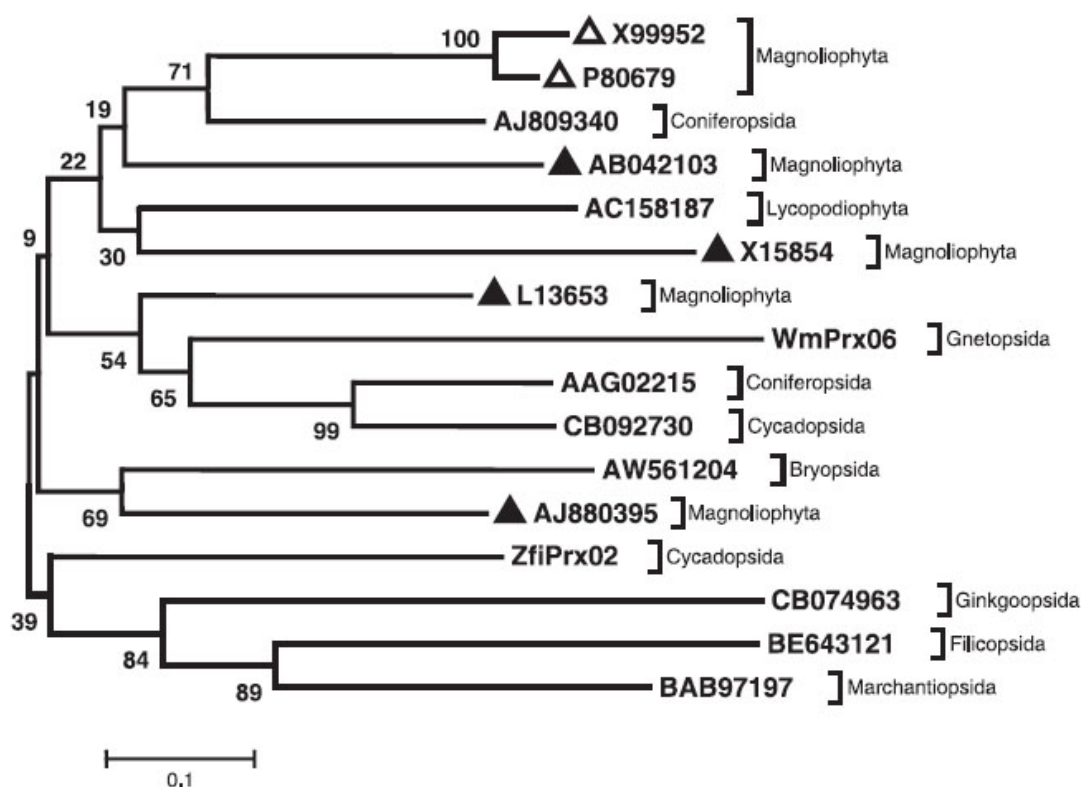


Figura 1.33. Árbol filogenético de las peroxidasas de tipo S de eudicotiledóneas (señaladas con triángulos negros) usando el método de la "Mínima evolución". Se identifican las secuencias y especies por los números de acceso a la base de datos: X99952 (*Arabidopsis thaliana*), P80697 (*Armoracia rusticana*), AJ809340 (*Picea abies*), AB042103 (*Asparagus officinalis*), AC158187 (*Selaginella moellendorffii*), X15854 (*Lycopersicon esculentum* Mill.), L13653 (*Lycopersicon esculentum*), WmPrx06 (*Welwitschia mirabilis* Hook), AAG02215 (*Pinus sylvestris*), CB092730 (*Cycas rumphii* Miq.), AW561204 (*Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.), AJ880395 (*Zinnia elegans*), ZfiPrx02 (*Zamia fischeri* Miq.), CB074963 (*Ginkgo biloba*), BE643121 (*Ceratopteris richardii* Brongn) y BAB97197 (*Marchantia polymorpha* L.). *Arabidopsis thaliana* (X99952) y *Armoracia rusticana* (P80679), peroxidasas de tipo G (triángulos blancos), aparecen como las ramas más evolucionadas dentro de las peroxidasas de clase III de las plantas. Tomado de Gómez-Ros y cols. 2007a.

La figura 1.34 muestra los patrones isoenzimáticos de algunas especies muy separadas en cualquiera de los dos árboles filogenéticos anteriormente estudiados.

Todas las especies muestran la presencia común no solo de análogos (isoenzimas de similar movilidad en el isoelectroenfoque) sino también de homólogos (isoenzimas de idéntica movilidad en el isoelectroenfoque) de la isoenzima de peroxidasa básica aislada de elementos traqueales diferenciados de *Zinnia elegans*. Este resultado coincide con comunicaciones previas que indican que las peroxidasas básicas constituyen la principal población de isoenzimas de peroxidasa en algunas gimnospermas como *Araucaria araucana* (Riquelme y Cardemil 1993), *Picea abies* (Koutaniemi y cols. 2005) y *Pinus sylvestris* (Tarkka y cols. 2001). Isoenzimas homólogas fueron también encontradas en el licófito *Selaginella martensii*. Esto coincide con el hecho de que *Selaginella martensii* muestra peroxidasas capaces de oxidar residuos S y ligninas tipo S. Peroxidasas básicas con puntos isoeléctricos (pI) próximos a 10,5, como las enzimas de *Zinnia elegans*, localizadas en la pared celular (Gabaldón y cols. 2005), han sido descritas también en musgos, como *Sphagnum magellanicum* Brid (Tutschek, 1979), y en hepáticas, como *Marchantia polymorpha* (Hirata y cols. 2000).

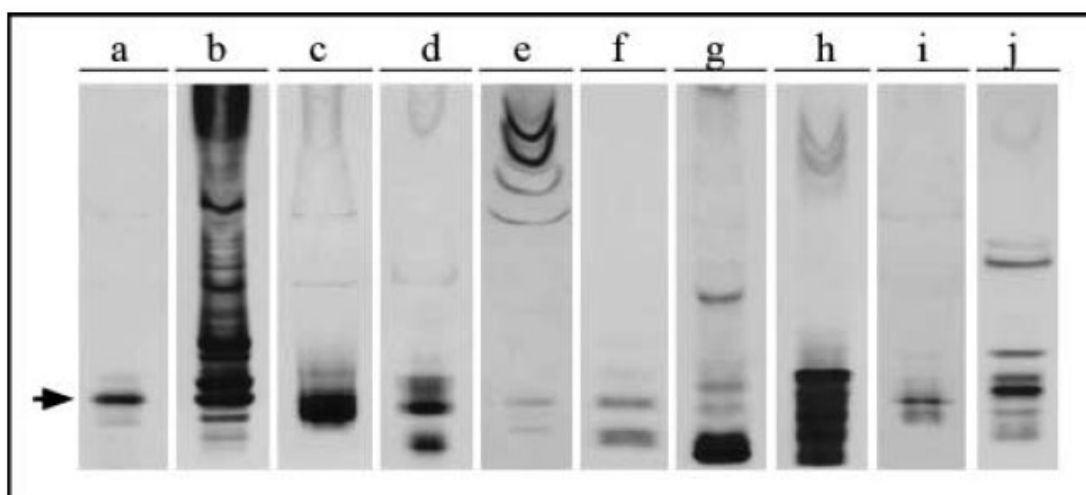


Figura 1.34. Modelos de isoenzimas de peroxidasa de los elementos traqueales de (a) *Zinnia elegans*, (b) *Selaginella martensii*, (c) *Cycas revoluta*, (d) *Ginkgo biloba*, (e) *Araucaria heterophylla*, (f) *Cupressus sempervirens*, (g) *Thuja orientalis*, (h) *Taxus baccata*, (i) *Pinus halepensis* y (j) *Ephedra viridis* obtenidos por isoelectroenfoque en no equilibrio de las proteínas del apoplasto y teñidas con 4-metoxi- α -naftol y H_2O_2 como sustratos. La flecha indica la posición de las peroxidasas homólogas de la peroxidasa básica de *Zinnia elegans*. Tomado de Gómez-Ros y cols. 2007a.

La homología entre parálogos en una planta está entre el 30% y el 100%, pero existen ortólogos muy relacionados aún entre plantas evolutivamente muy distantes. Todas las peroxidasas contienen aminoácidos esenciales conservados para sus propiedades catalíticas y para su propio plegamiento (Welinder y cols. 2002). Están estructuralmente relacionadas con otras hemoproteínas, peroxidasas de procariotas y hongos. Los aminoácidos clave que interactúan con el grupo hemo se encuentran también en hemoglobinas y citocromos.

El tipo de diversificación molecular de las peroxidasas resulta principalmente de la duplicación de genes. Los genes duplicados fueron fácilmente conservados porque

adquirieron nuevos modos de expresión, regulación (subfuncionalización) o nuevas funciones (neofuncionalización) (Bakalovic y cols. 2006).

Arabidopsis thaliana y arroz están completamente secuenciados y son considerados plantas modelo, pero no son representativos de la diversidad vegetal. La sucesiva secuenciación de otras especies permitirá un mejor conocimiento de la evolución de la peroxidasa en las plantas y la confirmación de la idea de que el número de isoformas de las peroxidasas de clase III se ha incrementado desde la aparición de las plantas terrestres (Bakalovic y cols. 2006).

Los modelos de relojes moleculares, basados en la construcción de árboles filogenéticos obtenidos con métodos basados en la distancia (Wolf y cols. 2002) y utilizados para trazar la historia evolutiva precisa de las peroxidasas de los tipos G y S, sugieren que las peroxidasas de tipo G constituyen el más evolucionado estado de la familia de peroxidasas de las plantas (Gómez-Ros y cols. 2007a, Gómez-Ros y cols. 2007b). Se podría pensar que las tres clases de peroxidasas evolucionaron de una sola secuencia ancestral (Zamocky 2004).

Las peroxidasas pueden ser marcadores claves para la evolución de las plantas, desde los primeros momentos de la colonización de la tierra hasta el impacto humano sobre la genética de las plantas cultivadas en la actualidad (Bakalovic y cols. 2006).

Las variadas funciones de las peroxidasas podrían ser caracterizadas y conseguir un mejor conocimiento del crecimiento de las plantas, la diferenciación y la interacción con el entorno, y eventualmente otras interesantes aplicaciones (Bakalovic y cols. 2006).

VII.2. Las peroxidasas en las plantas actuales

Las peroxidasas de clase III (EC 1.11.1.7, donador: hidrógeno-peróxido oxidorreductasa) están presentes en todas las plantas terrestres (Tabla 1.3). Los genes que codifican para esta familia son particularmente numerosos en Angiospermas. El alto número de isoenzimas y su destacable versatilidad catalítica permite que estén implicados en un gran número de procesos fisiológicos y de desarrollo a lo largo del ciclo vital de la planta (Passardi y cols. 2005).

Las peroxidasas de las plantas son un ejemplo de familia multigénica cuyo número de miembros aumenta desde que las plantas conquistaron la tierra debido a su constante evolución (Bakalovic y cols. 2006). El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene 73 genes que codifican para la peroxidasa (Tognolli y cols. 2002) y el arroz contiene 138 (Passardi y cols. 2004).

No se han encontrado secuencias codificantes para peroxidasas de clase III ni actividad en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* Dang (Passardi y cols. 2004). Por el contrario, en varias especies de *Chara* se ha detectado (Greppin y cols. 1986) actividad de peroxidasa de clase III por la oxidación de guayacol en presencia de H_2O_2 .

Tabla 1.3. Representación de los linajes más importantes de plantas encontrados en la PeroxiBase. De Bakalovic y cols. 2006.

Orden (número de especies/número de secuencias): Género	
Angiospermas	
Dicotiledóneas	
Rosidios	
Cucurbitales (3/7): <i>Cucumis</i> (2x), <i>Cucurbita</i> .	
Fabales (14/314): <i>Arachis</i> , <i>Cicer</i> , <i>Glycine</i> , <i>Lotus</i> , <i>Lupinus</i> (2x), <i>Medicago</i> (2x), <i>Phaseolus</i> (2x), <i>Pisum</i> , <i>Stylosanthes</i> , <i>Trifolium</i> , <i>Vigna</i> .	
Rosales (3/8): <i>Ficus</i> , <i>Malus</i> , <i>Urtica</i> .	
Fagales (1/2): <i>Quercus</i> .	
Malpigiales (10/92): <i>Euphorbia</i> , <i>Linum</i> , <i>Manihot</i> , <i>Mercurialis</i> , <i>Populus</i> (6x).	
Malvales (3/58): <i>Gossypium</i> , <i>Theobroma</i> .	
Sapindales (3/20): <i>Citrus</i> (2x), <i>Poncirus</i> .	
Brassicales (7/103): <i>Arabidopsis</i> , <i>Brassica</i> (2x), <i>Armoracia</i> , <i>Raphanus</i> , <i>Thellungiella</i> (2x)	
Vitaceae (1/21): <i>Vitis</i> .	
Asteridios	
Gentianales (3/10): <i>Coffea</i> , <i>Hedyotis</i> (2x).	
Lamiales (6/10): <i>Avicennia</i> , <i>Eucommia</i> , <i>Orobancha</i> (2x), <i>Scutellaria</i> , <i>Striga</i> .	
Solanales (11/199): <i>Capsicum</i> (2x), <i>Ipomoea</i> (2x), <i>Lycopersicon</i> (2x), <i>Nicotiana</i> (3x), <i>Petunia</i> , <i>Solanum</i> .	
Asterales (8/73): <i>Artemisia</i> , <i>Cichorium</i> , <i>Helianthus</i> (2x), <i>Gerbera</i> , <i>Lactuca</i> , <i>Stevia</i> , <i>Zinnia</i> .	
Apiales (1/1): <i>Petroselinum</i> .	
Ericales (1/1): <i>Vaccinium</i> .	
Saxifragales (1/6): <i>Ribes</i> .	
Caryophyllales (4/56): <i>Beta</i> , <i>Mesembryanthemum</i> , <i>Mirabilis</i> , <i>Spinacia</i> .	
Ranunculales (2/37): <i>Eschscholzia</i> , <i>Aquilegia</i> .	
Monocotiledóneas	
Magnolias	
Laurales (1/10): <i>Persea</i> .	
Magnoliales (1/11): <i>Liriodendron</i> .	
Piperales (1/0): <i>Saruma</i> .	
Liliopsidas	
Poales (15/655): <i>Aegilops</i> , <i>Ananas</i> , <i>Avena</i> , <i>Cenchrus</i> , <i>Hordeum</i> , <i>Lolium</i> , <i>Oryza</i> , <i>Saccharum</i> (2x), <i>Secale</i> , <i>Setoria</i> , <i>Sorghum</i> , <i>Triticum</i> (2x), <i>Zea</i> .	
Zingiberales (0/0) EST proyecto en desarrollo.	
Liliales (2/2): <i>Lilium</i> , <i>Alstroemeria</i> .	
Acorales (1/5): <i>Acorus</i> .	
Alismatales (1/1): <i>Spirodela</i> .	
Areciales (1/1): <i>Elaeis</i> .	
Asparagales (3/36): <i>Allium</i> , <i>Asparagus</i> , <i>Hyacinthus</i> .	
Magnoliófitas basales	
Austrobaileyales (1/0): <i>Illicium</i> .	
Nymphaeales (1/3): <i>Nuphar</i> .	
Amborellaceae (1/13): <i>Amborella</i> .	
Gimnospermas	
Gnetopsidas	
Gnetales	
Welwitschiales (1/1): <i>Welwitschia</i> .	
Coniferales (6/24): <i>Cryptomeria</i> , <i>Pinus</i> (3x), <i>Picea</i> (2x).	
Ginkgoales (1/8): <i>Ginkgo</i> .	
Cycadales (3/12): <i>Cycas</i> , <i>Zamia</i> (2x).	
Criptogamas (4/21)	
<i>Marchantia</i> , <i>Physcomitrella</i> , <i>Selaginella</i> , <i>Ceratopteris</i> .	
Algas	
Charales (0/0): ninguna secuencia disponible/actividad encontrada.	
Chlamydomonadales (0/0): ninguna secuencia disponible/actividad no encontrada.	

Un exhaustivo trabajo (Bakalovic y cols. 2006) para la elaboración de una base de datos confirma que las peroxidasas de clase III están presentes en todas las plantas terrestres (Tabla 1.3). Estas bases de datos permiten comparar resultados con los obtenidos anteriormente, como ya ha ocurrido con *Arabidopsis* y *Oryza* (Tognolli y cols. 2002, Duroux y Welinder 2003), para confirmar la presencia de secuencias que codifican peroxidasas de clase III.

Motivos estructurales comunes a peroxidasas de tipo S de angiospermas fueron también encontrados en peroxidasas de Gnetales, que poseen ligninas de los tipos G y S (Gómez-Ros y cols. 2007a, Logan y Thomas 1985), como *Welwitschia mirabilis*; en peroxidasas de Coniferales, como *Pinus sylvestris*, una especie que carece de ligninas de tipo S y en peroxidasas de gimnospermas basales (Cicadales y Ginkgoales), como *Cycas rumphii*, *Zamia fischeri* y *Ginkgo biloba*, que también carecen de peroxidasas de tipo S (Gómez-Ros y cols. 2007b, Logan y Thomas 1985). Motivos estructurales comunes a todas las peroxidasas de tipo S de eudicotiledóneas fueron también encontrados en el licopodio terrestre *Selaginella moellendorffii* y en el helecho acuático *Ceratopteris richardii*, ambos poseedores de ligninas de los tipos G y S (Gómez-Ros y cols. 2006a, Logan y Thomas 1985).

Sorprendentemente también se han encontrado (Gómez-Ros y cols. 2006) motivos estructurales comunes a todas las peroxidasas de tipo S de eudicotiledóneas en peroxidasas de *Physcomitrella patens* y de *Marchantia polymorpha*, dos plantas terrestres no vasculares. La presencia de peroxidasas de tipo S en *Marchantia polymorpha* está en concordancia con la aparición de sustancias derivadas de ligninas de tipo S en las paredes celulares de hepáticas (Logan y Thomas 1985).

El número de peroxidasas encontradas entre gimnospermas y angiospermas es tan elevado que no se puede dudar de la ubicua presencia de esta enzima en ambos grupos vegetales (Tabla 1.3).

Hasta muy recientemente, la mayoría de las peroxidasas de plantas con flores mejor caracterizadas (Østergaard y cols. 2000, Nielsen y cols. 2001) podían oxidar únicamente al alcohol coniferílico, y esto provocaba la creencia general de que las angiospermas eran ineficientes para la oxidación del alcohol sinapílico (Østergaard y cols. 2000). Sin embargo, se han publicado trabajos recientes de caracterización molecular y clonación de peroxidasas capaces de oxidar alcohol sinapílico en plantas vasculares (Gabaldón y cols. 2005, Sasaki y cols. 2006), incluyendo gimnospermas (Koutaniemi y cols. 2005), que carecen de ligninas de tipo S (Ros Barceló 1997). Esto podría significar que las peroxidasas capaces de oxidar alcohol sinapílico existen desde antes de la aparición de las ligninas de tipo S, y provoca varias objeciones sobre la actualmente aceptada visión de la evolución de la lignificación (Peter y Neale 2004).

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, nos fijamos como objetivo principal de esta tesis realizar un estudio de las ligninas y peroxidasas presentes en diferentes grupos de plantas basales. Para ello, definimos los siguientes objetivos concretos:

- 1) Estudiar la distribución histoquímica de la actividad peroxidasa en los traqueófitos *Isoetes fluitans*, *Isoetes hystrix*, *Selaginella martensii*, *Equisetum telmateia*, *Phyllitis scolopendrium* y *Pteridium aquilinum*; y comparar su relación espacial con la producción de ligninas.
- 2) Estudiar el patrón isoenzimático de peroxidasas de *Mastocarpus stellatus*, *Cystoseira baccata*, *Ulva rigida*, *Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens*, *Isoetes fluitans*, *Isoetes hystrix*, *Selaginella martensii*, *Equisetum telmateia*, *Ceratopteris thalictroides*, *Ceratopteris cornuta*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis*, *Pteridium aquilinum* y *Posidonia oceanica* y compararlo con el de *Zinnia elegans*. Analizarlo y establecer las posibles relaciones filogenéticas entre las especies citadas atendiendo a los patrones enzimáticos.
- 3) Estudiar la actividad enzimática de la peroxidasa en las especies citadas en el objetivo anterior, compararla con las demás y determinar la capacidad de oxidación de los sustratos de lignificación, estableciendo relaciones entre las distintas especies intentando descubrir posibles relaciones filogenéticas.
- 4) Analizar la estructura de sus ligninas, por medio de técnicas degradativas de la pared celular, para conocer la composición de las mismas y sus posibles similitudes o diferencias.
- 5) Comparar la distribución de unidades H/G/S en las ligninas para establecer si existe algún tipo de similitud entre ellas, si las mismas conducen a relaciones filogenéticas, y si los patrones obtenidos guardan alguna relación con los conocidos de gimnospermas y angiospermas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Material vegetal

Para realizar el estudio planteado se usaron un total de quince especies. Tres algas: *Mastocarpus stellatus* (Stackhouse) Guiry, *Cystoseira baccata* (S.G. Gmelin) P.C. Silva y *Ulva rigida* C. Agardh; una hepática: *Marchantia polymorpha* L.; un musgo: *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.; nueve helechos: *Selaginella martensii* Spring, *Isoetes fluitans* Romero, Amigo & Ramil-Rego, *Isoetes hystrix* Bory, *Equisetum telmateia* Ehrh, *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn, *Ceratopteris cornuta* (P. Beauv.) Lepr., *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newman, *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins y *Pteridium aquilinum* (L.) Kunhn; y una angiosperma acuática *Posidonia oceanica* (L.) Delile.

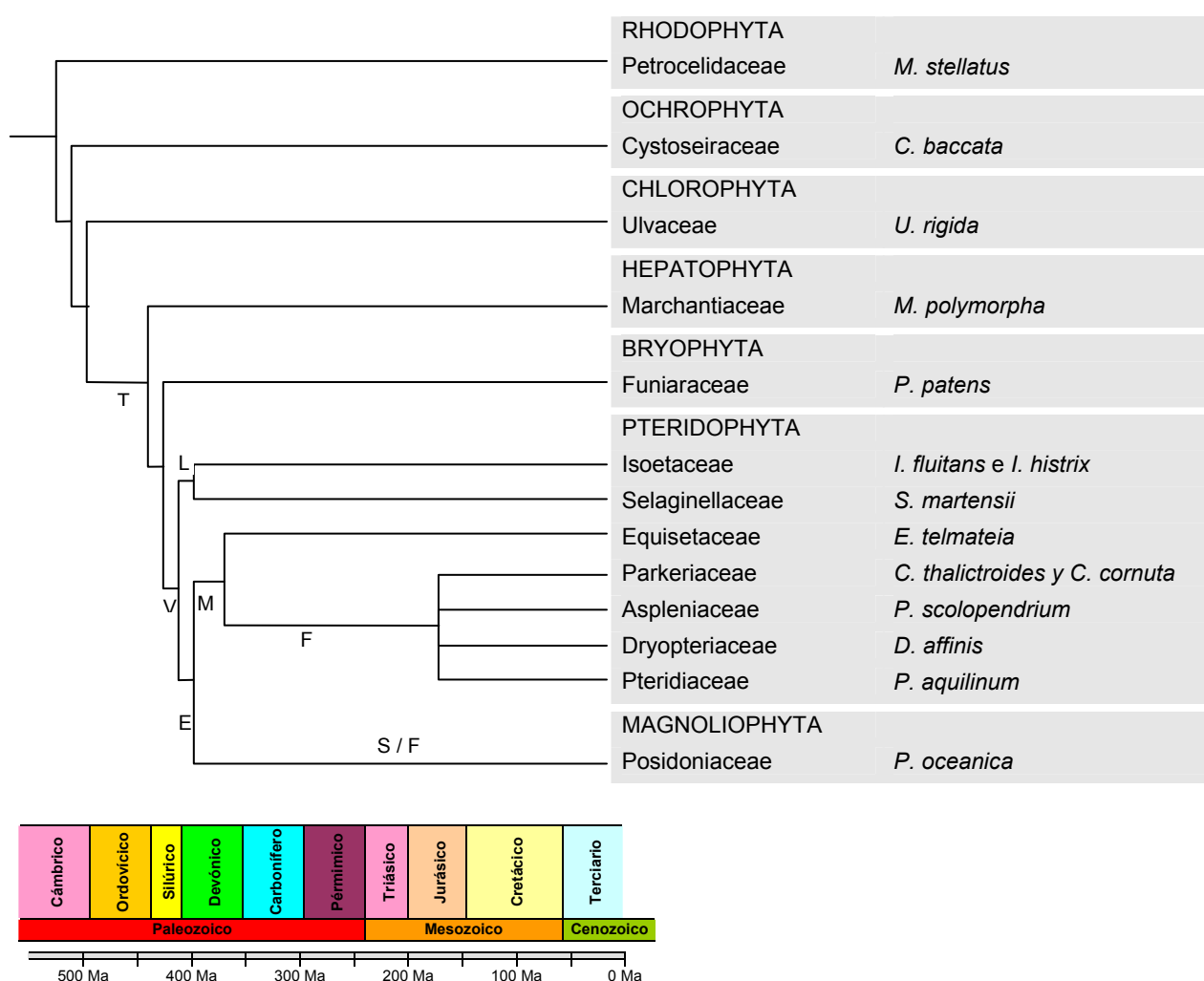


Figura 2.1.- Cronograma filogenético de las especies utilizadas, representado en relación con la escala de tiempo geológico, basado en datos morfológicos y moleculares de Bárbara y cols., 2005, Kenrick y Crane, 1997, Qiu y cols., 1999, Bhattacharya y Medlin, 1998, y Pryer y cols., 2004. Los nodos indican el momento en el que se produce la divergencia entre las especies relacionadas. T: plantas terrestres, V: plantas vasculares, L: licófitos, E: eufilófitas, M: monilófitos, F: filicófitos, S: plantas con semilla, F: plantas con flores, Ma: millones de años.

El núcleo de investigación lo constituyeron -en sentido amplio- los helechos. Tanto estos como el resto de las especies estudiadas fueron seleccionadas con criterios de variedad filogenética (Fig. 2.1), bien por que, desde el punto de vista evolutivo, forman parte de grupos más primitivos (algas y briófitos), bien por que la evolución las llevó a readaptarse a un medio que sus ancestros habían abandonado (*P. oceanica*).

I.1. Algas

Aunque aparentemente constituyen un grupo homogéneo, la distancia filogenética que separa los tres grandes grupos de algas macroscópicas (rodófitos, feófitos y clorófitos), e incluso la que existe entre especies del mismo grupo, es enorme. Los estudios realizados hasta el momento no han permitido encontrar ligninas en este grupo (Bhattacharya y Medlin 1998).

Mastocarpus stellatus (Rhodophyta, alga roja) (Figura 2.2 A) es un alga roja que habita en el litoral inferior y en el infralitoral. Se considera que las algas rojas fueron los primeros organismos pluricelulares. Su origen se remonta al Precámbrico.

Cystoseira baccata (Ochrophyta, alga parda) (Figura 2.2 B) puede alcanzar hasta 2 m de longitud y vive fijada sobre las rocas del infralitoral o del litoral inferior. La característica distintiva de las algas pardas es que poseen un cordón parenquimatoso que, aunque no constituye un verdadero sistema conductor, sí muestra un elemental grado de organización.

Ulva rigida (Chlorophyta, alga verde) (Figura 2.2 C) ocupa la zona mesolitoral. Las algas verdes y las plantas terrestres forman un linaje monofilético que incluye protistas y taxones superiores (Graham 1999). Los clorófitos en general y las carales (un orden de aquellas) en particular, son aceptadas como los organismos antecesores de briófitos, helechos, gimnospermas y angiospermas (Bhattacharya Medlin 1998).

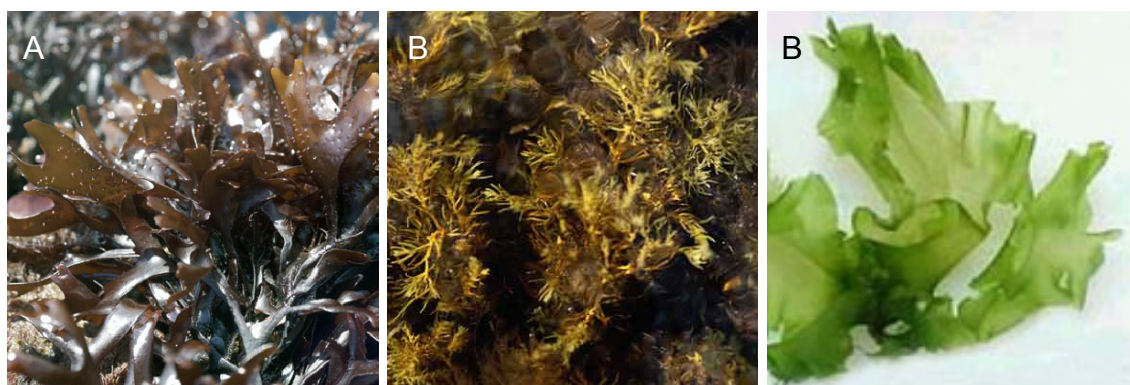


Figura 2.2. Algas: *Mastocarpus stellatus* (A), *Cystoseira baccata* (B) y *Ulva rigida* (C).

I.2. Plantas terrestres basales (hepáticas y musgos)

Marchantia polymorpha (Marchantiopsida, hepática) (Figura 2.3 A) y *Physcomitrella patens* (Bryopsida, musgo) (Figura 2.3 B) normalmente se han ubicado

dentro del mismo phylum, pero actualmente se las considera lo suficientemente diferentes como para colocarlas en distintos phyla: Hepathophyta y Bryophyta, respectivamente. A diferencia de *Marchantia polymorpha* que no tiene xilema ni células conductoras de agua (hidroides) pero que presenta ligninas, *Physcomitrella patens*, que pertenece a la subclase Bryidae dentro de los musgos verdaderos, muestra un sistema conductor de agua interno que contiene hidroides y células vivas con paredes engrosadas (estereidas) que, no obstante, no lignifican (Ligrone y cols. 2000).

El interés en el estudio de plantas basales para facilitar nuestro conocimiento sobre angiospermas se ha incrementado con el desarrollo de *Physcomitrella patens* como un sistema modelo (Nothnagel y Nothnagel 2007) ya que el genoma de este musgo ha sido secuenciado en su totalidad y está disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

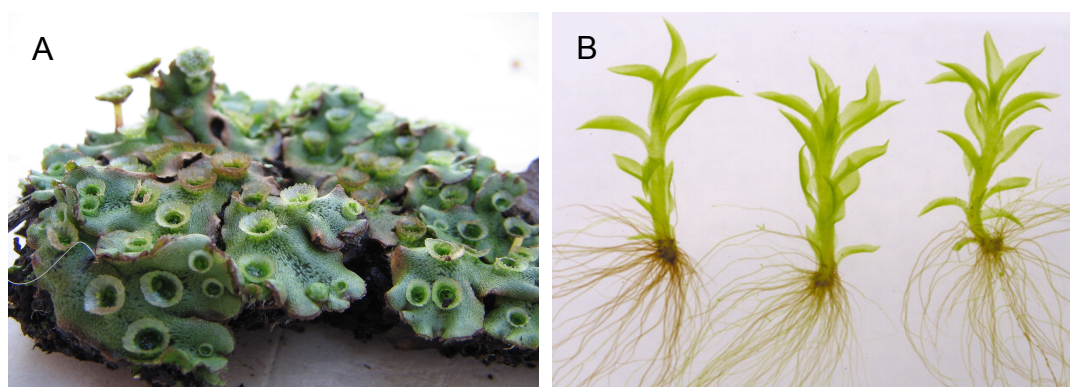


Figura 2.3. Plantas terrestres basales: *Marchantia polymorpha* (A) y *Physcomitrella patens* (B).

I.3. Traqueofitos (plantas vasculares)

I.3.1. Licófitos

Todos los miembros de este grupo se caracterizan por poseer licófilos, hojas con meristemos intercalares (Figura 2.4).

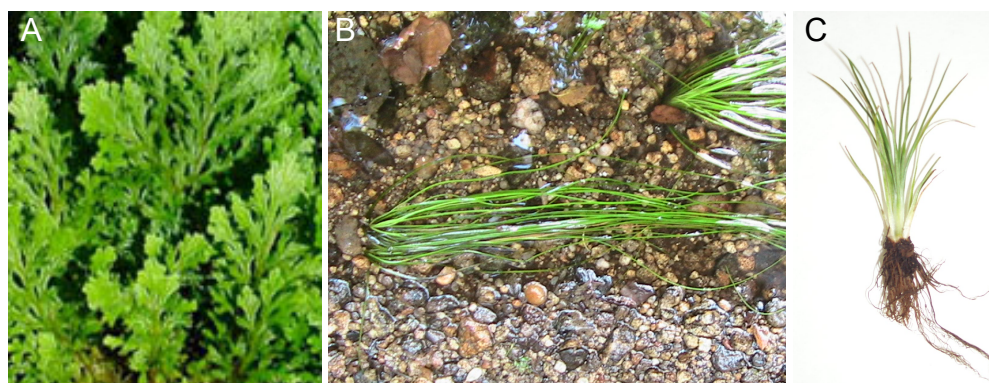


Figura 2.4. Licopodios: *Selaginella martensii* (A), *Isoetes fluitans* (B) y *Isoetes hystrix* (C).

Selaginella martensii (Lycopsida, licófito) (Figura 2.4 A), pertenece a uno de los grupos más tempranamente divergentes entre las plantas vasculares existentes (Pryer y cols. 2001). Los licopodios muestran elementos vasales (Schneider y Carlquist 2000), cuyas paredes celulares contienen xilanos (Carafa y cols. 2005) y xiloglucanos (Popper y Fry 2004), componentes que juegan un papel pivotante en la evolución de los tejidos vasculares (Figura 2.5), y cuya aparición precedió a la divergencia evolutiva de los licopodiofitos, los helechos y las plantas con semillas (Carafa y cols. 2005).

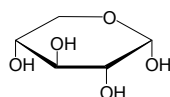


Figura 2.5. Xilosa. Molécula base para la síntesis de xilanos y xiloglucanos.

Isoetes fluitans (Figura 2.4 B) e *Isoetes hystrix* (Figura 2.4 C) (Lycopsida, licófitos), son especies muy próximas a *S. martensii* desde el punto de vista filogenético. Ambos grupos, Isoetales y Selaginetales, son heterosporéas.

Aunque los licófitos actuales son casi todas plantas relativamente pequeñas, algunos miembros fósiles de este linaje, como *Lepidodendron* (Figura 2.6), fueron grandes formas arborescentes que dominaron la tierra del Carbonífero y que hoy son el mayor componente de los depósitos de carbón (Stewart y Rothwell 1993).

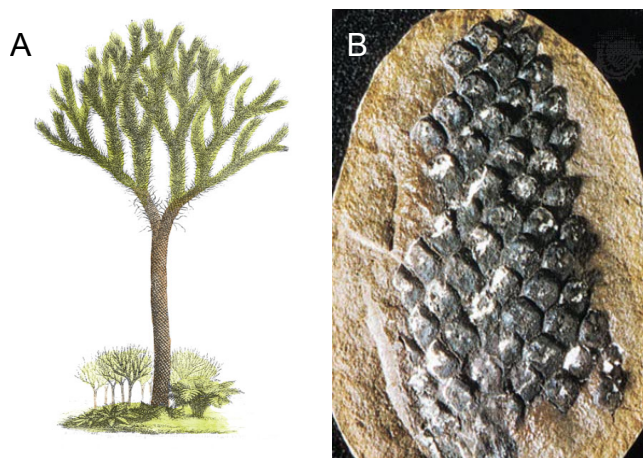


Figura 2.6. *Lepidodendron*. Licófito del carbonífero. Recreación del organismo completo (A). Fragmento fósil (B).

1.3.2. Eufilófitos

La característica distintiva de este grupo es la presencia de eufilos (hojas con meristemas apicales o marginales y un hueco asociado en la estela vascular), ramas laterales que terminan en esporangios y un distintivamente lobulado cordón como xilema primario (Pryer y cols. 2004). Los eufilófitos actuales pertenecen a dos clados: monilófitos y plantas con semillas (espermatófitos) (Kenrick y Crane 1997, Nickrent y cols. 2000, Pryer y cols. 2001).

I.3.2.1. Monilófitos

Poseen una vascularización distintiva, con un protoxilema confinado en lóbulos del cordón xilemático (Stein 1993). Los análisis de características variadas (Kenrick y Crane 1997, Renzaglia y cols. 2000, 2001 y 2002, Nickrent 2000 y Pryer y cols. 2001) han confirmado el carácter monofilético de este grupo.

I.3.2.1.1 Esfenófitos

Equisetum telmateia (Equisetopsida, cola de caballo) (Figura 2.7), pertenece a un grupo de plantas con fósiles datados en el Devónico tardío. Los miembros de este clado tienen apéndices en verticilios (Figura 2.6 B), una característica estela, hojas altamente reducidas, esporangios sobre esporangióforos que están agrupados en estróbilos en los miembros actuales (Kenrick y Crane 1997). Los fósiles de este grupo son diversos e incluyen representantes arborescentes como *Calamites*, con xilema secundario. Estas grandes formas desaparecieron en el Pérmico, pero algunos representantes herbáceos sobrevivieron, incluyendo el Mesozoico *Equisetites*. En la actualidad existen 15 especies de "cola de caballo", todas ellas relativamente pequeñas en estatura comparadas con sus leñosos antecesores y tienen una amplia distribución, mayoritariamente en regiones templadas.



Figura 2.7. Esfenófitos: *Equisetum telmateia*. Formación natural (A). Verticilio (B).

I.3.2.1.2. Filicófitos (helechos verdaderos)

Ceratopteris thalictroides y *Ceratopteris cornuta* (Filicopsida, helechos verdaderos) (Figura 2.8 A y B), pertenecen al género *Ceratopteris* formado por helechos acuáticos que presentan traqueidas y elementos vasales con punteaduras helicoidales (Carlquist y Schneider 2000), una coexistencia que ha sido descrita en Gnetales y dicotiledóneas pero no en las monocotiledóneas, los helechos u otras pteridofitas. La presencia de los vasos en *Ceratopteris* es destacable dado el hábitat acuático de este helecho, y plantea varias cuestiones sobre el significado funcional y evolutivo de la presencia de vasos en un helecho que presenta máxima disponibilidad de agua.

Pteridium aquilinum (Filicopsida, helecho verdadero) (Figura 2.8 E), fue uno de los primeros helechos en los que se descubrió la presencia de vasos y posteriormente fue confirmada también la de traqueidas (Carlquist y Schneider, 2001). En el mismo grupo y con una posición relativa similar desde el punto de vista evolutivo están *Phyllitis scolopendrium* (Filicopsida, helecho verdadero) (Figura 2.8 C) y *Dryopteris affinis* (Filicopsida, helecho verdadero) (Figura 2.8 D).

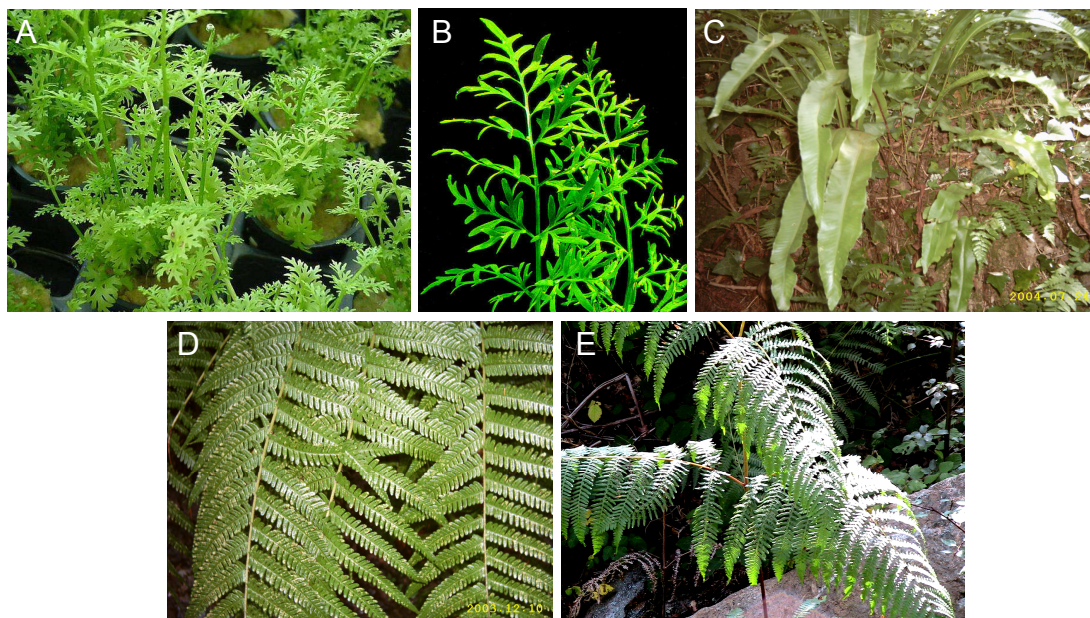


Figura 2.8. Helechos verdaderos: *Ceratopteris thalictroides* (A), *Ceratopteris cornuta* (B), *Phyllitis scolopendrium* (C), *Dryopteris affinis* (D) y *Pteridium aquilinum* (E).

1.3.2.2. Angiospermas

Posidonia oceanica (L.) Delile (Magnoliophyta, hierba marina) (Figura 2.8), es una monocotiledónea marina. Actualmente se considera que las "hierbas marinas" evolucionaron de antiguas angiospermas terrestres que volvieron al mar en el Cretácico, hace 100 millones de años (Larkun y Den Hartog 1989). Por lo tanto, no representan un intermediario evolutivo entre plantas primarias acuáticas y plantas vasculares terrestres sino un grupo de plantas vasculares adaptadas secundariamente a la vida acuática (Klap y cols. 2000).



Figura 2.9. Angiosperma: *Posidonia oceanica*

El hecho de que estas plantas conserven los mecanismos de producción de lignina, muy costosos desde el punto de vista metabólico, es motivo de discusión.

I.4. Condiciones de muestreo y crecimiento.

Se recogieron ejemplares completos de *Mastocarpus stellatus* y de *Ulva rigida* en A Coruña, durante el mes de abril, sobre substrato rocoso, en el litoral inferior de la playa de As Lapas, orientada hacia el norte y semiexpuesta (coordenadas geográficas (c.g.): 43° 22,366' N / 008° 24,995' W, altitud: 0 m). De *C. baccata* en la playa expuesta de Mera (Oleiros), también en el mes de abril, (c.g.: 43° 23,011' N / 008° 20,479' W, altitud: 0 m) después de días de fuerte oleaje.

Ejemplares -también completos- de *Marchantia polymorpha* fueron recogidos en O Carballo (Oleiros), en la zona de riego continuo del vivero Jardín Coruña, entre el emparrillado de madera construido para el paso de los clientes y en las macetas de otras plantas situadas en la zona (c.g.: 43° 19,383' N / 008° 20,690' W, altitud: 30 m).

El briófito *Physcomitrella patens* fue proporcionado por el Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid y obtenido en condiciones estériles como describen en Benito y Rodríguez-Navarro (2003).

Isoetes fluitans fue obtenido en el cauce del Río Forxa en Guitiriz (Lugo). (c.g.: 43° 11,274' N / 007° 53,392' W, altitud: 453 m). *Isoetes hystrix* fue recogido en Melide (A Coruña), en una zona pantanosa, en los márgenes de charcas de diferentes tamaños y profundidades (c.g.: 42° 53,978' N / 007° 58,605' W, altitud: 449 m). Ambas especies durante el mes de mayo.

Selaginella martensii fue adquirida en la Floristería Muguet de A Coruña, en maceta y sobre humus.

Equisetum telmateia aparece en abundancia, durante los meses de abril a octubre, en la zona próxima a los arcones de la carretera que discurre paralela al embalse de Sabón, en el municipio de Arteixo (A Coruña), lugar en el que fue recogido (c.g.: 43° 19,417' N / 008° 29,911' W, altitud: 26 m).

Ceratopteris thalictroides y *Ceratopteris cornuta* son utilizados como plantas de acuario. Fueron adquiridos en Don Perro, un establecimiento de esta especialidad de A Coruña.

Phyllitis scolopendrium y *Dryopteris affinis* fueron recogidos en los márgenes del río Mandeo, en el lugar de Chelo, situado en Coirós (A Coruña), (c.g.: 43° 15,871' N / 008° 09,765' W, altitud: 26 m), mientras que *Pteridium aquilinum* se obtuvo en las proximidades de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña en A Zapateira (A Coruña), (c.g.: 43° 19,799' N / 008° 24,263' W, altitud: 135 m). Las tres especies en los meses de mayo y junio.

Posidonia oceanica fue recogida en la costa de la Dehesa de Campoamor (Alicante), (c.g.: 37° 51,861' N / 0° 45,341' W).

En todos los casos, tras la obtención, las muestras fueron lavadas. Se dividió el material recogido en dos partes. Una se utilizó para la realización, en fresco, de las

pruebas que así lo exigen (histoquímicas y cinéticas) y, la otra, se congeló a -80°C para la realización del resto de la experimental (lignificación y enzimología).

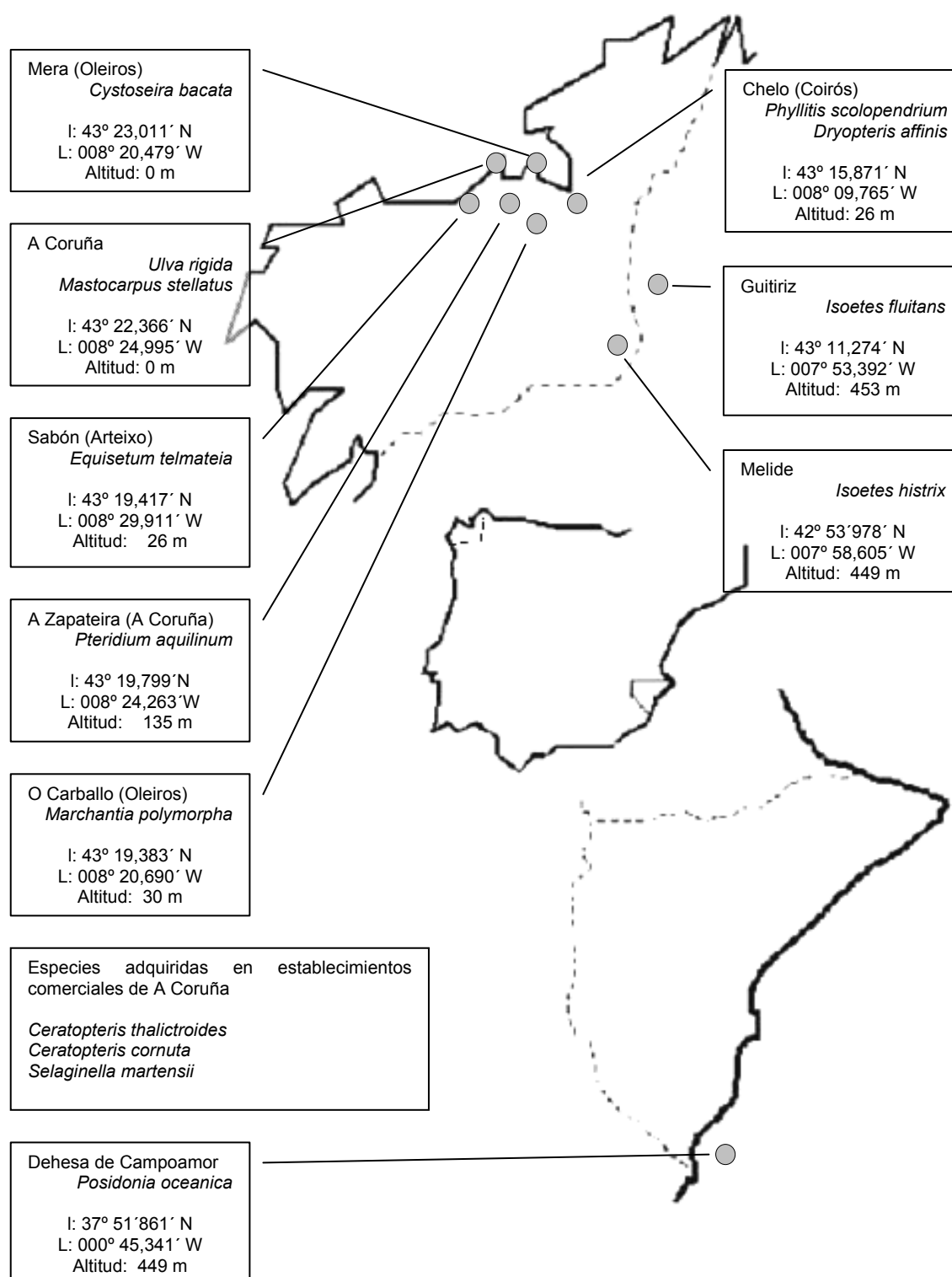








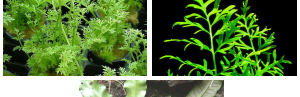






Figura 2.10. Lugares de recogida de las distintas especies.

La diversidad en forma y características entre las distintas especies hizo que en cada caso fuese necesario emplear el órgano o la parte que reunía las mejores condiciones de trabajo (Tabla 2.1).

Tabla 2.1.- Sistemática de las distintas especies y órganos o partes de los individuos empleados en la experimentación, basada en datos morfológicos y moleculares de Bárbara y cols., 2005, Kenrick y Crane, 1997, Qiu y cols., 1999, Bhattacharya y Medlin, 1998, y Pryer y cols., 2004.

División Clase Orden Familia	Especie		Órgano/parte seleccionado
RODOPHYTA Florideophyceae Gigartinales Petrocelidaceae	<i>M. stellatus</i>		Individuos completos
OCHROPHYTA Phaeophyceae Fucales Cystoseiraceae	<i>C. baccata</i>		Individuos completos
CLOROPHYTA Ulvophyceae Ulvales Ulvaceae	<i>U. rigida</i>		Individuos completos
HEPATOPHYTA Marchantiopsida Marchantiales Marchantiaceae	<i>M. polymorpha</i>		Individuos jóvenes completos
BRYOPHYTA Bryopsida Funariales Funariaceae	<i>P. patens</i>		Individuos completos (tras 60 días de cultivo)
PTERIDOPHYTA Lycopsida Selaginellales Selaginellaceae	<i>S. martensii</i>		Fronde
PTERIDOPHYTA Lycopsida Isoetales Isoetaceae	<i>I. fluitans</i> <i>I. hixtrix</i>		Fronde
PTERIDOPHYTA Equisetopsida Equisetales Equisetaceae	<i>E. telmateia</i>		Fronde: cilindro central. Individuos jóvenes
PTERIDOPHYTA Filicopsida Polypodiales Parkeriaceae	<i>C. thalictroides</i> <i>C. cornuta</i>		Fronde
PTERIDOPHYTA Filicopsida Aspleniales Aspleniaceae	<i>P. scolopendrium</i>		Fronde: cilindro central. Individuos jóvenes
PTERIDOPHYTA Filicopsida Aspleniales Dryopteridaceae	<i>D. affinis</i>		Fronde: cilindro central. Individuos jóvenes
PTERIDOPHYTA Filicopsida Plypodiales Pteridiaceae	<i>P. aquilinum</i>		Fronde: cilindro central. Individuos jóvenes.
MAGNOLIOPHYTA Liliopsida Alismatales Posidoniaceae	<i>P. oceanica</i>		Hoja

II. Técnicas histoquímicas

Las tinciones histoquímicas se realizaron sobre secciones de grosor comprendido entre 100 y 300 μm . Las observaciones y fotografías se realizaron con una lupa Nikon SMZ 150 y las fotografías con una cámara Nikon DXM1200.

II.1. Localización histoquímica de la actividad peroxidasa

La determinación histoquímica de la actividad peroxidasa se realizó incubando las secciones directamente con tetrametilbencidina (TMB) 50 μM disuelta en agua, en tampón Tris acetato 50 mM pH 5,0 durante 15-20 minutos a 25°C. Se realizaron controles en presencia de ácido ferúlico que se utilizó a una concentración de 100 μM .

II.2. Localización histoquímica de las ligninas. Test de Wiesner

Para la tinción citoquímica e histoquímica de ligninas por este método, que es específico para los grupos cinamaldehído (Pomar y cols. 2002), las secciones se tiñeron con una disolución que contenía floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) (Figura 2.11) al 1% (p/v) en HCl/EtOH (25:75) (v/v) durante 10-15 minutos y, posteriormente, se observaron en campo claro. El floroglucinol reacciona específicamente con grupos cinamaldehído presentes en las ligninas originando un producto que confiere una coloración roja a la zona del corte en la que tiene lugar la reacción.

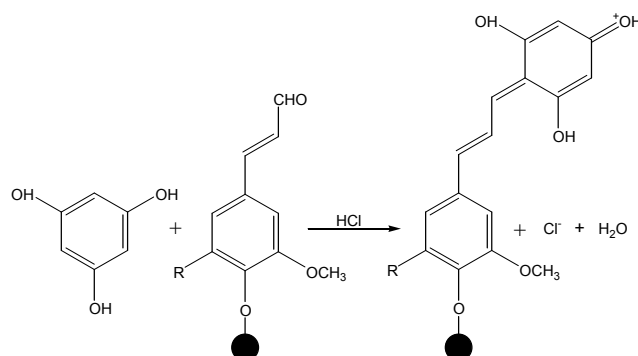


Figura 2.11. Esquema propuesto para la reacción del floroglucinol con O-4-aldehídos cinamílicos terminales contenidos en las ligninas. R puede ser H (aldehído coniferílico) o OCH₃ (aldehído sinapílico). Tomado de Pomar y cols. 2002.

III. Estudio de las ligninas

III.1. Aislamiento de paredes celulares

Para el aislamiento de las paredes celulares se siguió el método de Pomar y cols. (2002). Para ello, 10 g de tejido fresco se homogeneizaron en 30 mL de agua destilada. El homogeneizado se centrifugó a 3000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual, se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó

tres veces en una solución al 1% de Tritón X-100, realizando la centrifugación en las mismas condiciones. Seguidamente, el precipitado se lavó con agua hasta conseguir la total eliminación de Tritón X-100. A continuación, se realizaron cuatro lavados con etanol absoluto. El precipitado final se filtró a vacío sobre un disco de celulosa, realizándose varios lavados con éter etílico, hasta conseguir el secado total de las paredes celulares.

III.2. Cuantificación de ligninas

Para la cuantificación de las ligninas se utilizó el método del bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis, 1988). Para ello, se pesaron 25 mg de paredes celulares a las que se añadió bromuro de acetilo al 25% (p/p) en ácido acético en un volumen de 5 mL. Esta mezcla se incubó, en un baño de bloque metálico para tubos TEMBLOC de Selecta, a 70 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejó que enfriaran los tubos, se añadieron 10 mL de NaOH 2N y finalmente se enrasaron a 100 mL con ácido acético. Tras dejar reposar las muestras, por si quedaba alguna partícula en suspensión, se midió la absorbancia a 290 nm frente a un blanco. Para calcular la concentración de ligninas se usó un factor de 20,091 g⁻¹cm⁻¹ según la estimación de Iiyama y Wallis (1988), aplicando la ecuación:

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{100(A_m - A_b)V}{aW}$$

<i>A_m</i>	<i>Absorbancia de la muestra.</i>
<i>A_b</i>	<i>Absorbancia del blanco.</i>
<i>V</i>	<i>Volumen de solución (l).</i>
<i>a</i>	<i>Absortividad estándar de la lignina</i>
<i>W</i>	<i>Peso de muestra (g).</i>

III.3. Oxidación con nitrobenzeno

La oxidación alcalina con nitrobenzeno de las paredes celulares y los análisis de HPLC de los productos obtenidos se llevaron a cabo según Pomar y cols. (2002). Para ello, usando tubos pírrex de tapón de teflón que se agitaron suavemente cada cierto tiempo, se incubaron 25 mg de paredes celulares con 2,5 mL de NaOH 2N y 0,25 mL de nitrobenzeno, en un baño de bloque metálico para tubos TEMBLOC de Selecta, a 170 °C durante 150 minutos. Transcurrido este tiempo, tras enfriar los tubos, se añadió a cada uno 5 mL de H₂O y se extrajo la fase acuosa en un embudo de decantación con 5 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). Esta extracción se realizó tres veces con el fin de eliminar los productos de degradación del nitrobenzeno. A continuación, el residuo acuoso de las tres extracciones se acidificó a un pH entre 1,0 y 2,0 con HCl 5N, tras lo cual, se realizaron -de nuevo- tres extracciones con una mezcla de diclorometano-acetato de etilo (1:1) (v/v). Al conjunto de las extracciones se le añadió sulfato sódico anhidro (Na₂SO₄) en exceso y, tras haberlo filtrado, se evaporó el disolvente orgánico a sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi R-200). El residuo final se disolvió en

metanol, se pasó a través de un filtro de 0,45 μm y se llevó a un volumen de 1 mL con metanol.

Las muestras se analizaron por cromatografía líquida (HPLC) en una columna de fase reversa Spherisorb ODS2 C18 usando un equipo Waters Alliance, provisto de un detector de diodos Waters 996. Para llevar a cabo la cromatografía se utilizaron las mezclas de solventes A, que contenía acetonitrilo al 50% y ácido acético al 2% y B, que era ácido acético al 2%. El programa usado consistió en un gradiente de: 35% solvente A, 65% solvente B, minuto 0; 40% solvente A, 60% solvente B, minuto 5; 50% solvente A, 50% solvente B, minuto 14 y 35% solvente A, 65% solvente B, minuto 16. El flujo fue de 1 mL \cdot min⁻¹.

La cuantificación del *p*-hidroxibenzaldehído, la vanillina y el siringaldehído se realizó a 310 nm usando los correspondientes estándares comerciales.

III.4. Tioacidolisis

La tioacidolisis se realizó según Pomar y cols. (2002). Para ello, 15 mg de paredes celulares se mezclaron con 10 mL de una disolución formada por BF₃ dietileterato 0,2 M en una mezcla 8,75/1 (v/v) dioxano/etanotiol (EtSH). La tioacidolisis se realizó en un tubo de vidrio pirex con tapón de teflón, en un baño de bloque metálico para tubos TEMBLOC de Selecta, a 100 °C durante 4 horas, agitando suavemente cada cierto tiempo.

Transcurridas las cuatro horas, se añadieron 30 mL de agua destilada con el fin de detener la reacción y enfriar la mezcla. Seguidamente, se ajustó el pH de la mezcla a un valor entre 3,0 y 4,0 mediante una solución 0,4 M de carbonato sódico.

Una vez ajustado el pH, se procedió a la extracción con 30 mL de diclorometano, empleando un embudo de decantación, recuperando la fase orgánica y descartando la acuosa. Esta extracción se realizó tres veces, tras lo cual, los volúmenes obtenidos se juntaron, y se añadió sulfato sódico anhidro (Na₂SO₄) en exceso para eliminar el agua arrastrada. A continuación, se procedió a la evaporación del diclorometano en un evaporador rotatorio (Büchi R-200) a 40 °C. El residuo final se disolvió en 0,5 mL de diclorometano.

Finalmente, 10 μL de la solución se mezclaron con 100 μL de BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) y 10 μL de piridina (grado GC), para obtener los derivados de trimetil-sililo.

Análisis de los derivados trimetil-silil por cromatografía de gases-espectrometría de masas

Para el análisis de las muestras anteriormente obtenidas, se utilizó un cromatógrafo Thermo Finnigan, Trace GC, equipado con una columna DB-XLB, J&W, de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno, usando helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL \cdot min⁻¹. El programa de temperatura fue desde 90 °C hasta 270 °C, a una velocidad de 5 °C min⁻¹. El cromatógrafo se acopló a un detector de masas

Thermo Finnigan, Polaris Q, que trabajó con una intensidad de impacto electrónico de 70 eV.

IV. Determinación de la actividad peroxidasa

IV.1. Obtención de la actividad peroxidasa presente en el apoplasto

Se cortaron los cilindros centrales de las frondes de los helechos en secciones de 5 mm de longitud y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se sometieron a infiltración a vacío empleando una bomba de vacío Millipore durante un período de 5 minutos a 1,0 KPa, y a 4 °C en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0, que contenía KCl 1,0 M y CaCl_2 50 mM.

Una vez realizada la infiltración, se escurrieron las secciones y a continuación se centrifugaron en una jeringuilla dentro de un tubo de centrifuga a 1000xg, durante 5 minutos a 4 °C.

La fracción proteica obtenida se purificó por diálisis, durante 24 horas, frente a agua destilada *milli-Q*, empleando membranas de diálisis de celulosa (Sigma).

IV.2. Obtención de la actividad peroxidasa total

Las muestras fueron homogeneizadas a 4°C, en un mortero con arena y tampón de extracción en una proporción 1:2 (p/v). El tampón estaba compuesto por EDTA 1 mM, KCl 1 M, Tris 50 mM, ajustando el pH a 7,5 con HCl. En el momento de la homogeneización se añadieron 0,5 g de PVPP por cada 10 gramos de tejido. A continuación se filtró el homogeneizado a través de dos gasas, previamente enfriadas y se descartó el material retenido. El eluido se centrifugó a 27000xg durante 30 minutos a 4 °C. La fracción proteica obtenida se purificó por diálisis, durante 24 horas, frente a agua destilada *milli-Q*.

El resultado de esta purificación se consideró como peroxidasa total.

IV.3. Medidas de la actividad peroxidasa

Los ensayos cinéticos y las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV/Visible Varian, Cary 3E. Las actividades enzimáticas se expresaron en todos los casos en nanokatales (nkat), unidad que se define como aquella cantidad de enzima capaz de convertir un nanomol de sustrato en producto por segundo.

La actividad peroxidasa se determinó con diferentes sustratos en un medio de reacción que contenía tampón Tris acetato 50 mM, pH 5,0 y H_2O_2 500 μM , utilizando como donadores de electrones: 1,0 mM de 4-metoxi- α -naphthol ($\Delta\epsilon_{593}=21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), o 50 μM de siringaldazina ($\Delta\epsilon_{530}=27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Ros Barceló y cols. 2002a). La actividad peroxidasa también se midió con los precursores de las ligninas a una

concentración de 0,1 mM: alcohol *p*-cumarílico ($\Delta\epsilon_{259}=14,756 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), alcohol coniferílico ($\Delta\epsilon_{262}=9,75 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), alcohol sinapílico ($\Delta\epsilon_{271}=4,14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), *p*-cumarilaldehído ($\Delta\epsilon_{324}=20,732 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), coniferilaldehído ($\Delta\epsilon_{341}=13,44 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y sinapilaldehído ($\Delta\epsilon_{340}=11,95 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Ros Barceló y Pomar 2001).

V. Técnicas electroforéticas

V.1. Isoelectroenfoque en equilibrio en placa

Para la realización del isoelectroenfoque se utilizaron geles comerciales de poliacrilamida, Ampholine PAGplate de Pharmacia-Biotech, con una concentración T= 5% y C= 3% y un rango de pH de los geles entre 3,5-9,5. El gel tenía unas dimensiones finales de 65 x 110 mm.

Para llevar a cabo el enfoque se usó un sistema Multiphor II de Pharmacia, manteniendo la temperatura constante a 10 °C mediante un circuito cerrado de refrigeración conectado a un estabilizador de temperatura Multitemp III de Pharmacia-Biotech. En el interior de la cubeta se colocaron dos frascos con una solución de hidróxido sódico 1 N con el objeto de permitir la disolución del CO₂ desprendido durante el isoelectroenfoque, ya que este CO₂ puede provocar variaciones en el gradiente de pH deseado.

Cargado de las muestras y desarrollo del isoelectroenfoque

Los geles, en su soporte de plástico, se colocaron sobre la placa de porcelana del Multiphor II de Pharmacia depositándose entre el plástico y la placa una gota de queroseno para facilitar una temperatura homogénea en toda la superficie del gel. Seguidamente, se colocaron unas bandas de isoelectroenfoque de Pharmacia empapadas en soluciones hidrolíticas, de hidróxido sódico para la banda del cátodo y de ácido fosfórico para la banda del ánodo. A continuación, se depositaron 10 µL de muestra sobre los papeles de aplicación de Pharmacia, de 5 x 5 mm de tamaño, colocados en el centro del gel. Por último se desarrolló el isoelectroenfoque a 1500 V y 8 mA (2 W) durante 90 minutos.

Revelado de la actividad peroxidasa con 4-metoxi- α -naftol

El revelado de las isoenzimas de la peroxidasa con 4-metoxi- α -naftol (4-MN) se realizó incubando los geles durante 15-30 minutos, en agitación y a 25 °C, en un medio que contenía 4-MN 1 mM y H₂O₂ 0,5 mM, en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0. Tras la tinción, los geles se lavaron con agua destilada (López-Serrano y cols. 2004) y se procesaron con un escáner HP 2300 c.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Localización histoquímica de la actividad peroxidasa y de las ligninas

I.1. Estudio histoquímico de la actividad peroxidasa

Las tres especies de licófitos estudiadas (*Isoetes fluitans*, *Isoetes hystrix* y *Selaginella martensii*) dieron resultados positivos en la tinción con TMB, que pone de manifiesto la presencia conjunta de peroxidasas y H_2O_2 (Figura 3.1).

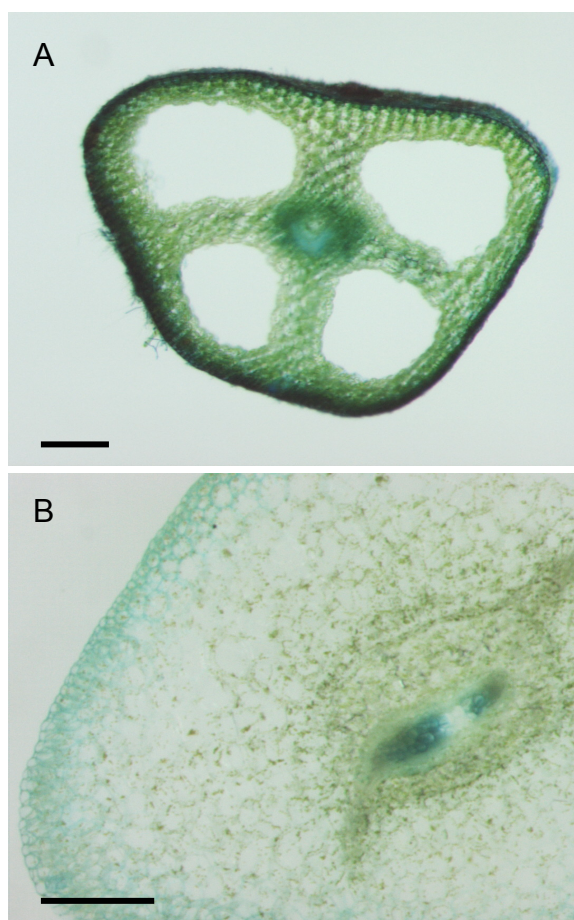


Figura 3.1. Secciones transversales de *Isoetes fluitans* (A) y *Selaginella martensii* (B) después de ser teñidas con TMB para poner de manifiesto la presencia de peroxidasas. Barra 300 μ m.

El patrón de distribución de las peroxidasas es similar. Las peroxidasas se expresan en el cordón vascular central y en las células epidérmicas, aunque la tinción es más continua y uniforme en *Selaginella martensii* (Figura 3.1B) que en *Isoetes fluitans* (Figura 3.1A).

También fueron positivos los resultados cuando se tiñeron con TMB secciones del esfenófito *Equisetum telmateia* (Figura 3.2). Las secciones de tejido son diferentes en el nudo (Figuras 3.2A y 3.2B) y en el entrenudo (Figura 3.2C y 3.2D) ya que las segundas son huecas en el centro. Aún así, la peroxidasa aparece en las mismas zonas, rodeando al canal carinal y, más difusamente, en la zona de cortex que se sitúa entre los canales valeculares. En *Equisetum* los haces vasculares forman una eustela

constituida por haces discretos dispuestos formando un anillo alrededor de un hipotético eje central.

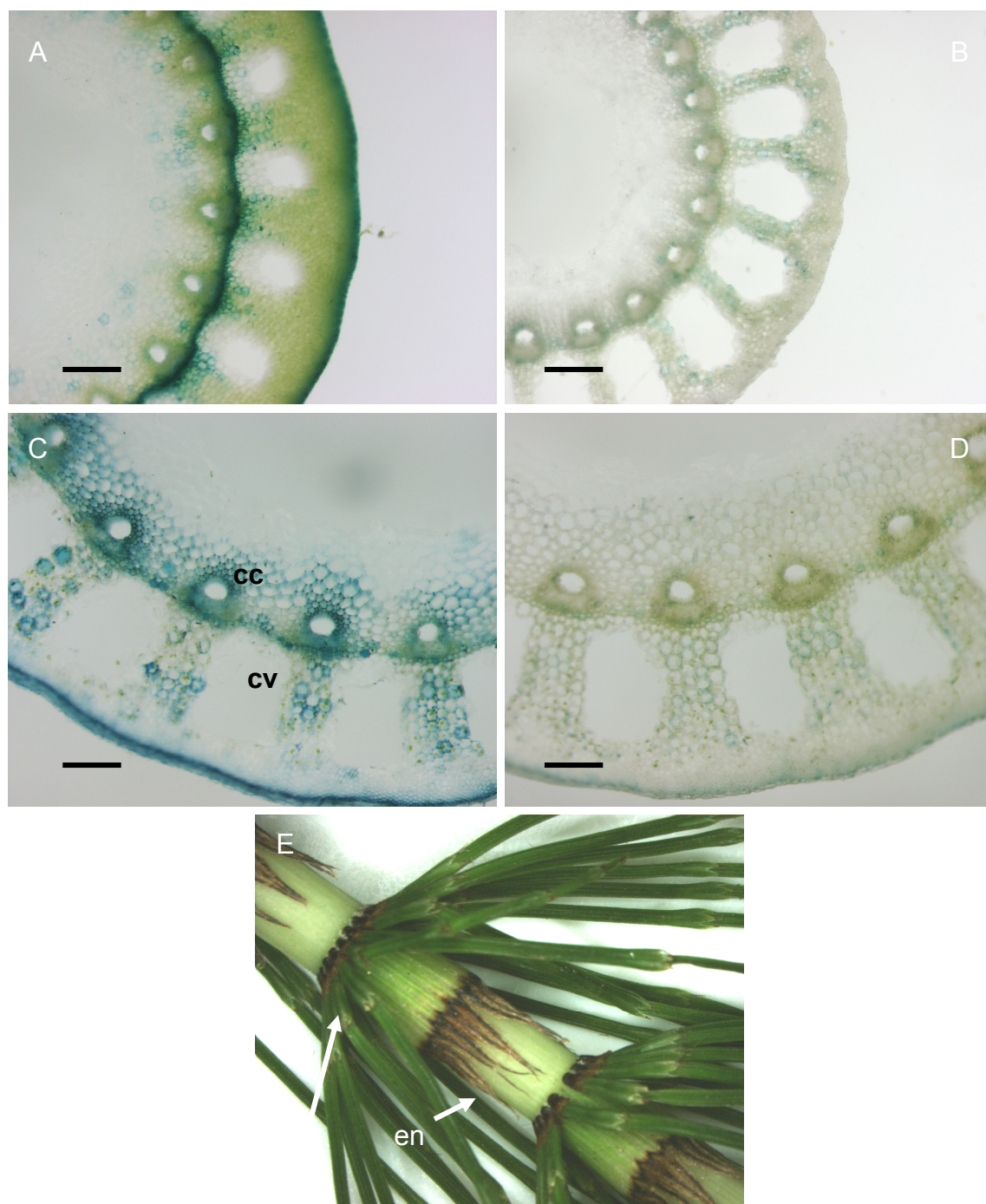


Figura 3.2. Secciones transversales de *Equisetum telmateia*. Nudo (A y B), entrenudo (C y D) después de ser teñidas con TMB para poner de manifiesto la presencia de peroxidasas (A y C), con TMB y ácido ferúlico, que actúa como inhibidor de las mismas (B y D). Parte de *Equisetum telmateia* (E) en la que se muestra el nudo (n) y el entrenudo (en). Canal carinal (cc), canal vascular (cv). Barra: 300 µm.

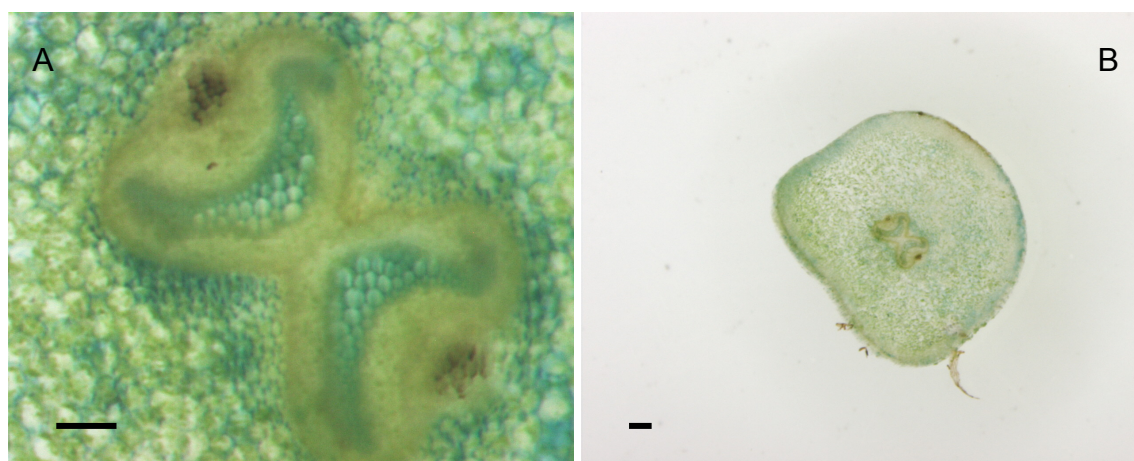


Figura 3.3. Secciones transversales de *Phyllitis scolopendrium* (A y B) después de ser teñidas con TMB para poner de manifiesto la presencia de peroxidasas. Barra 300 μm .

La tinción de cortes histológicos de los filicófitos *Phyllitis scolopendrium* y *Pteridium aquilinum* dio también resultados positivos para la peroxidasa al emplear como sustrato TMB (Figura 3.3).

Phyllitis scolopendrium (Figura 3.3A y 3.3B) produce peroxidasa de forma localizada en el cordón vascular central, dividido en dos partes con estructuras perfectamente simétricas (Figura 3.3A) y en la epidermis (Figura 3.3B), aunque se produce también una cantidad difusa de peroxidasa en la zona cortical.

Pteridium aquilinum también tiene una importante producción de peroxidasa que se distribuye de forma poco específica por todo el corte.

Los resultados indican que todas las especies analizadas disponen de peroxidasas. Aunque los patrones de producción de las mismas son diferentes, tienen un denominador común, aparecen fundamentalmente en las zonas próximas a los haces vasculares, aunque los diseños de los mismos muestran grandes diferencias entre especies.

Las tinciones indicadas son atribuibles a la peroxidasa ya que los controles en presencia de ácido ferúlico no mostraron reacción.

En varias de las especies (*Isoetes fluitans*, *Isoetes hystrix*, *Selaginella martensii* y *Phyllitis scolopendrium*) hay otra zona en la que se produce peroxidasa, la epidermis o sus proximidades.

Todas las especies son plantas vasculares y la presencia de peroxidasas es condición indispensable para que se produzca la lignificación de las paredes celulares de las células que formen los haces conductores (traqueidas o/y vasos).

1.2. Localización histoquímica de ligninas

El test de Wiesner (Pomar y cols. 2002), basado en la reacción del reactivo de floroglucinol con las ligninas en medio ácido, revela la presencia de grupos cinamaldehídos en las ligninas (Geiger y Fuggerer 1979).

Los licopodios estudiados muestran (Figura 3.4) los típicos patrones de vascularización de las especies de este grupo. El haz vascular central dibuja la estela propia de los licopodios en la que se forma un cordón central en el que se colocan alternativamente haces de xilema y de floema, dibujando una plectostela típicamente anfifloica o anficribal.

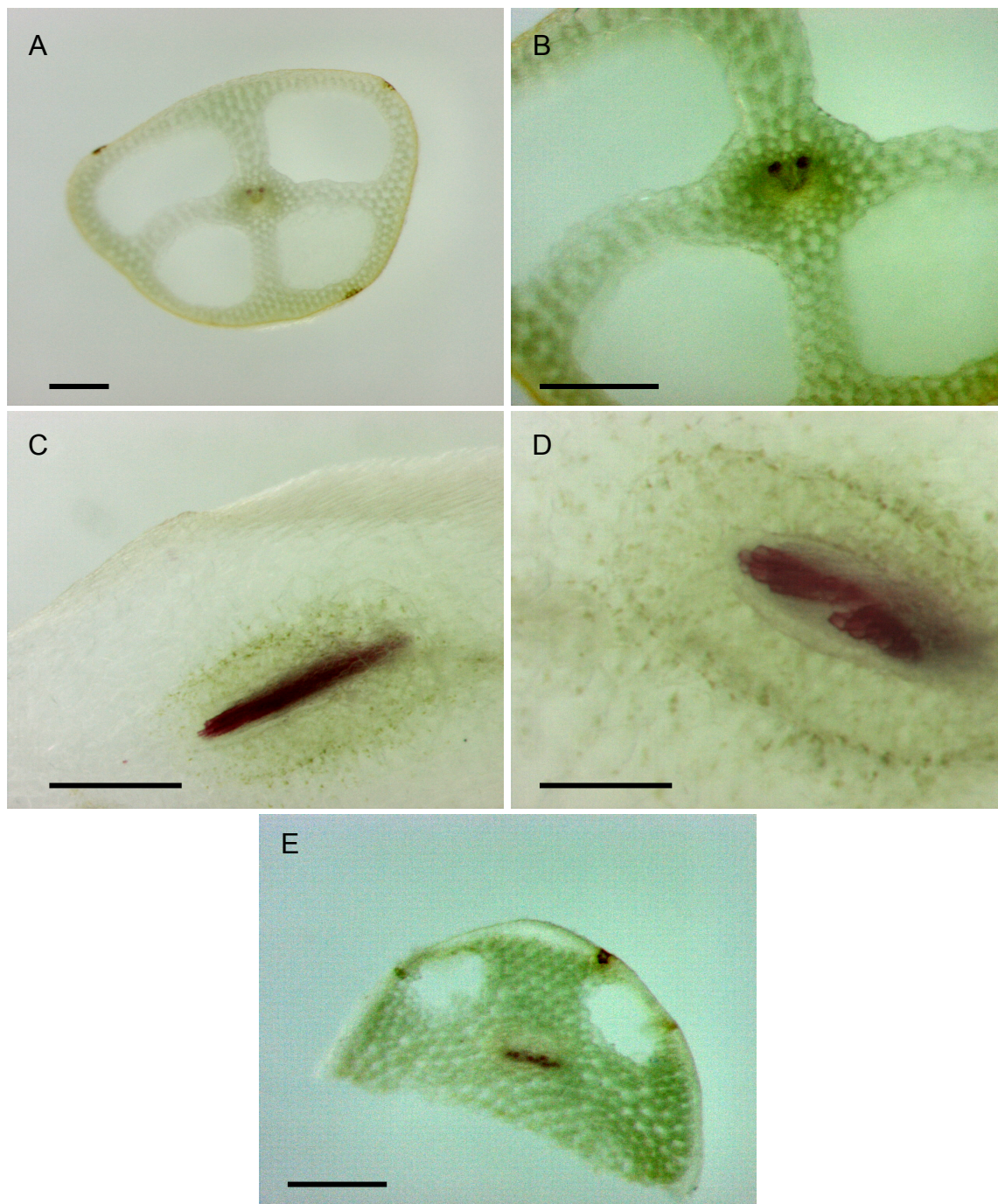


Figura 3.4. Secciones transversales de licopodios: *Isoetes fluitans* (A y B), de *Selaginella martensii* (C y D) e *Isoetes hystrix* (E) después de ser teñidas con floroglucinol para poner de manifiesto la presencia de ligninas. Barra 300 μ m.

Aunque tenue, *Isoetes fluitans* presenta lignificación en la zona periférica (Figura 3.4A y 3.4B), en la zona epidérmica. Con anterioridad se ha propuesto (Raven 1987)

que las ligninas pudieron haber cumplido un papel inicial de defensa química contra herbívoros y que después sus funciones evolucionaron a las de conducción y sostén. Esto explicaría el patrón de lignificación descrito.

Isoetes histrix (Figura 3.4E) y *Selaginella martensii* (Figura 3.4C y 3.4D) presentan lignificación, exclusivamente en la zona vascular y prácticamente restringida al xilema, mientras que los tejidos del floema, solo presentan una tinción débil.

Es de destacar la presencia de enormes espacios huecos, llenos de aire, que forman el aerénquima en *Isoetes fluitans* y, en menor medida, en *Isoetes histrix*. Ambas especies están totalmente relacionadas con el medio acuático, la primera vive completamente sumergida en el agua, en ríos limpios y en zonas de corriente y la segunda en las proximidades de lagos o pequeñas acumulaciones de agua. Esto plantea también la incógnita que representa que plantas que han vuelto al medio acuático, o no lo han abandonado totalmente nunca, sigan manteniendo una maquinaria costosa de síntesis de ligninas.

La figura 3.5 muestra los resultados obtenidos para la detección de ligninas en el esfenófito *Equisetum telmateia*. El test de Wiesner resultó claramente positivo. Las ligninas se depositan en lugares y, sobre todo, cantidades diferentes, dependiendo de que el corte histológico corresponda a una zona de nudo (Figura 3.5A y 3.5B) o de entrenudo (Figura 3.5C y 3.5D). El esquema vascular o estela de esta especie presenta una distribución en forma de eustela, propio además, de gimnospermas y de angiospermas dicotiledóneas.

Tanto en el nudo como en el entrenudo, los haces vasculares se disponen en bandas discretas distribuidas en forma circular alrededor de un hipotético eje central. En cada uno de ellos el xilema se dispone hacia el interior, y rodeando parcialmente el canal carinal, y el floema hacia el exterior. Esto es evidente al provocar la autofluorescencia de las ligninas, al iluminar el corte histológico con luz UV ($\lambda = 380$ nm) (Figura 3.5E). En la zona del nudo, además, las ligninas también aparecen en la zona cortical que se sitúa entre los canales valeculares, grandes espacios por los que circula el aire, que separan cada uno de los trazos que dará lugar a los distintos elementos del verticilo típico de los esfenófitos o colas de caballo.

Mientras que en el nudo la lignificación es muy intensa, en el entrenudo se produce una débil lignificación que queda reducida a la zona próxima al canal carinal, y dos filas de células que delimitan el floema.

El patrón de lignificación que presenta *Phyllitis scolopendrium* (Figura 3.6A y 3.6B) es un cordón central en el que se disponen alternativamente haces de xilema y floema, incluso con tejido cortical entre esos haces.

La tinción con floroglucinol de las ligninas de *Pteridium aquilinum* (Figura 3.6C y 3.6D) presenta un complicado patrón que engloba al sistema vascular y a todo el contorno del corte, la epidermis y las primeras capas celulares, a partir de ella, presentan también una intensa coloración.

El corte histológico ofrece un conjunto de haces totalmente diferenciados unos de otros que se conoce, en conjunto, como dictiostela. Siendo cada uno de los haces

una meristela formada por xilema y floema. Este último rodeando al primero, aunque no en todas las subunidades.

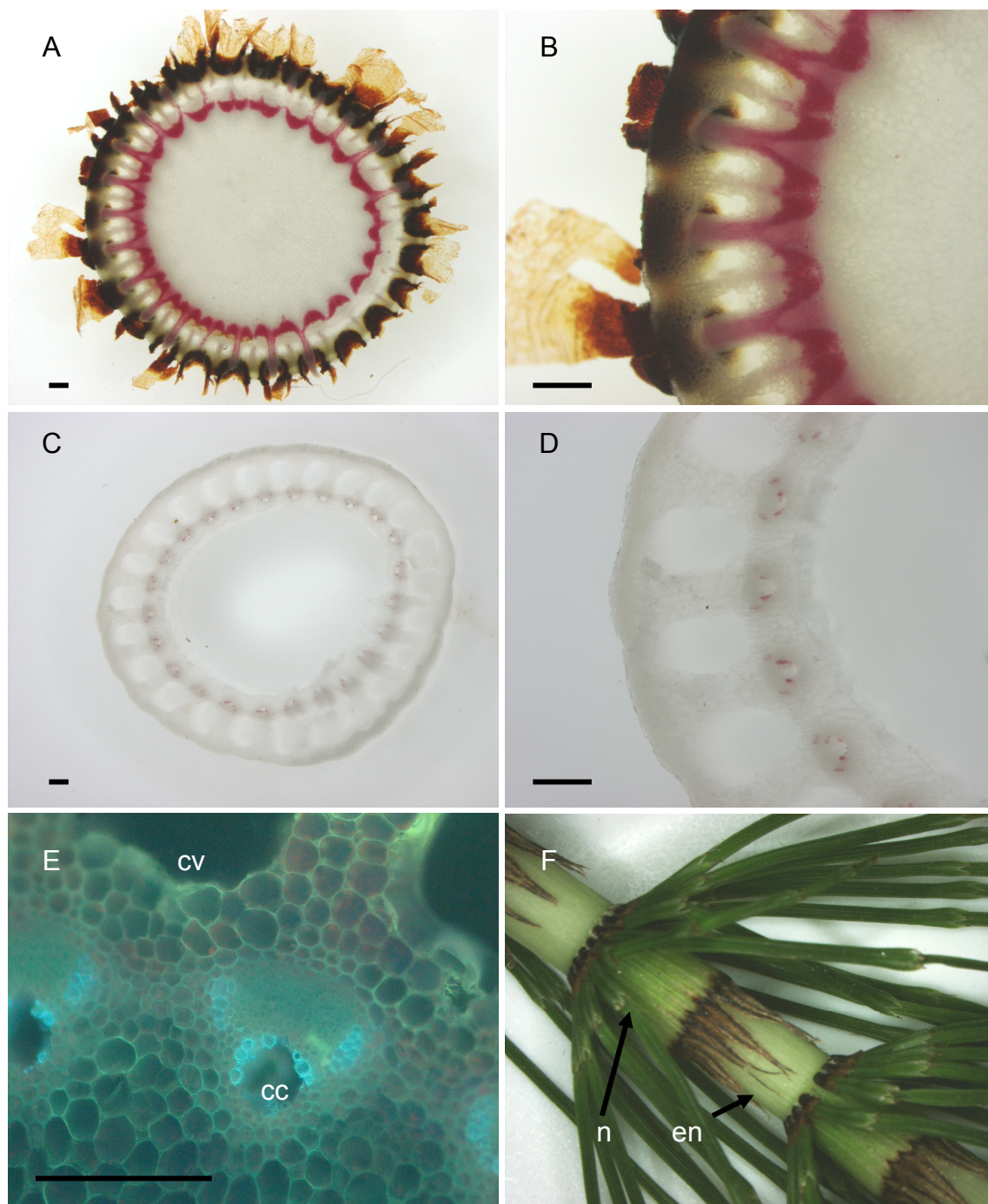


Figura 3.5. Secciones transversales de *Equisetum telmateia*, del nudo (A y B) y del entrenudo (C, D y E) después de ser teñidas con floroglucinol (A, B, C y D) para poner de manifiesto la presencia de ligninas. Detección de ligninas por autofluorescencia con UV ($\lambda = 380$ nm) (E). Parte de *Equisetum telmateia* (F) en la que se muestra el nudo (n) y el entrenudo (en). Canal carinal (cc), canal valecular (cv). Barra 300 μ m.

Todas las especies estudiadas presentan lignificación en distintos grados de intensidad y con distintos patrones, desde los licófitos, considerados basales entre los traqueófitos hasta los filicófitos o helechos más evolucionados. Esa lignificación se

produce, en todos los casos, en el tejido vascular de las plantas y en *Isoetes fluitans* y en *Pteridium aquilinum*, además, en la zona próxima a la epidermis, lo que apuntaría a funciones de sostén o de defensa como ya fue apuntado por Sperry (2003) y Raven (1987).

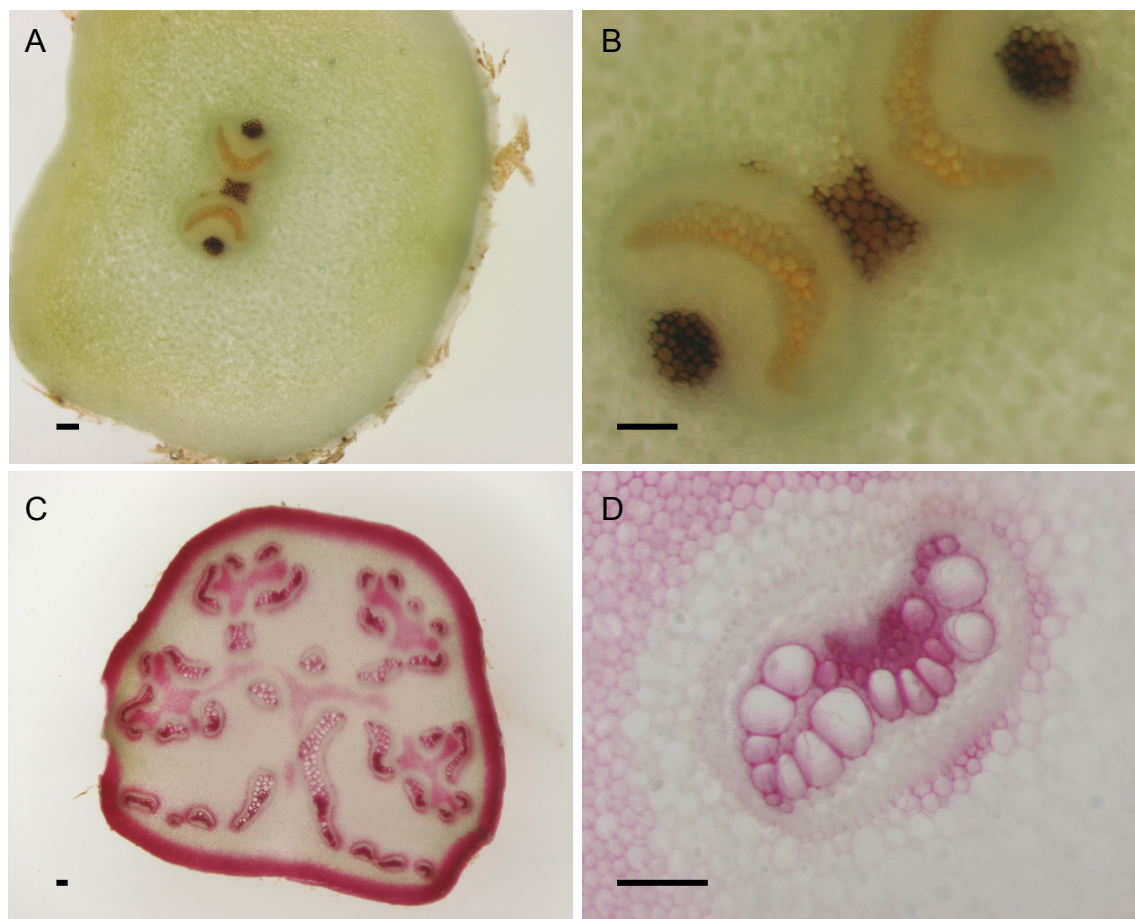


Figura 3.6. Secciones transversales de *Phyllitis scolopendrium* (A y B) y de *Pteridium aquilinum* (C y D) después de ser teñidas con floroglucinol para poner de manifiesto la presencia de ligninas. Barra 300 μm .

Carlquist y Schneider (2001) confirmaron trabajos anteriores en los que se apuntaba la presencia de vasos en el xilema del licófito *Selaginella martensii* y del filicófito *Pteridium aquilinum*, al mismo tiempo que informaron de la presencia de los mismos elementos en el xilema del filicófito acuático del género *Ceratopteris*. Siendo en el caso de *Pteridium aquilinum* los únicos elementos conductores del xilema. En el resto de las especies sometidas a estudio las unidades de los haces vasculares son las traqueidas.

Los distintos patrones son un recorrido por la teoría de la estela, atribuida a Lotsy (1909) que explica todos los cambios sufridos por el sistema vascular de los traqueófitos desde el punto de vista evolutivo y que se conservan en las distintas especies actuales en función de su posición filogenética.

II. Estudio de la lignificación

II.1. Cuantificación de ligninas

Tras detectar la presencia de ligninas en algunas de las especies estudiadas se procedió a la determinación del contenido de ligninas, de todas las especies, empleando el método del bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis, 1988) (Tabla 3.1).

Los resultados muestran que la cantidad de ligninas es muy variable, sin que se pueda establecer un patrón atendiendo al lugar que ocupan las distintas especies en el árbol filogenético y al mismo tiempo encontrando ciertas particularidades que, en principio, cuestionarían la eficacia del método del bromuro de acetilo cuando se aplica en igualdad de condiciones a especies de origen y características tan diversas.

Llama poderosamente la atención que se detecten cantidades importantes de ligninas en el grupo de algas (Tabla 3.1) cuando no se han descrito con anterioridad procesos de lignificación en las mismas. Las cantidades medidas, aunque comparativamente menores con respecto al conjunto, superan a las obtenidas en especies vasculares como los filicófitos (helechos verdaderos) del género *Ceratopteris* (Tabla 3.1, muestras 9 y 10), los licófitos del género *Isoetes* y la angiosperma *Posidonia oceanica* (Tabla 3.1, muestra 14), a los que une la característica común de ser organismos acuáticos.

Destaca el elevado valor medido en las muestras de la hepática *Marchantia polymorpha* y del briófito *Physcomitrella patens* (Tabla 3.1, muestras 4 y 5). Del carácter basal de ambas especies se esperarían valores menores, en el primer caso y nulos en el segundo ya que se ha descrito que *Marchantia polymorpha* lignifica mientras que *Physcomitrella patens* no.

Las cantidades más altas de ligninas entre las especies estudiadas corresponden a *Pteridium aquilinum* (Tabla 3.1, muestra 13), filicófito generalmente considerado como poseedor de un sistema vascular más evolucionado entre los helechos, característica que se puede hacer extensiva a *D. affinis* (Tabla 3.1, muestra 12) que ofrece unos resultados muy parecidos.

Pteridium aquilinum y el género *Ceratopteris* tiene vasos en su sistema vascular (Carlquist y Schneider 2001).

Los licófitos *Isoetes fluitans* e *Isoetes hystrix* (Tabla 3.1, muestras 6 y 7) presentan valores menores de ligninas. Se trata de especies acuáticas o totalmente vinculadas a hábitats acuáticos. El primero vive completamente sumergido, a merced de la corriente de los ríos, y el segundo es de muy pequeño tamaño y ocupa los bordes de lagos y lagunas.

Con valores intermedios en la cantidad de ligninas medida se encuentra el esfenófito *Equisetum telmateia* (Tabla 3.1, muestra 8).

Este método para la determinación de ligninas, el bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis 1990), depende de la solubilización de fragmentos de lignina y de las cantidades empleadas, usando un coeficiente de extinción de $20,1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1}$. Tiene el problema de que puede sobreestimar significativamente la cantidad de lignina cuando

las sustancias que no forman parte de las ligninas pero que absorben en el UV son también solubilizadas (Anterola y Lewis 2002).

Tabla 3.1. Cuantificación de ligninas en las distintas especies vegetales estudiadas con el método del bromuro de acetilo.

	Especie	mg ligninas / g pared celular
1	<i>Mastocarpus stellatus</i>	53,0 ± 8,0
2	<i>Ulva rigida</i>	62,0 ± 9,0
3	<i>Cystoseira baccata</i>	31,0 ± 4,0
4	<i>Marchantia polymorpha</i>	186,0 ± 6,0
5	<i>Physcomitrella patens</i>	184,0 ± 20,0
6	<i>Isoetes fluitans</i>	60,0 ± 5,0
7	<i>Isoetes histrix</i>	61,0 ± 8,0
8	<i>Equisetum telmateia</i>	95,0 ± 13,0
9	<i>Ceratopteris thalictroides</i>	37,0 ± 1,0
10	<i>Ceratopteris cornuta</i>	55,0 ± 3,0
11	<i>Phyllitis scolopendrium</i>	91,0 ± 9,0
12	<i>Dryopteris affinis</i>	174,0 ± 3,0
13	<i>Pteridium aquilinum</i>	194,0 ± 17,0
14	<i>Posidonia oceanica</i>	45,0 ± 10,0

Este es seguramente el caso de las algas y del musgo *Physcomitrella patens*. La falta de resultados en los análisis de las ligninas por degradación de las mismas hace pensar que la estimación calculada con el método del bromuro de acetilo es atribuible a otras sustancias diferentes de las ligninas que absorben en los mismos valores de UV.

Otro de los problemas del método es que no ha sido establecido si el coeficiente de extinción puede servir adecuadamente para todas las especies, e incluso, para todas las etapas de desarrollo de cada especie (Anterola y Lewis 2002).

II.2. Caracterización de ligninas mediante tioacidolisis y oxidación con nitrobenceno: Monómeros estructurales y grado de polimerización

La tioacidolisis es una técnica degradativa que rompe las ligninas por los enlaces β -O-4, que constituyen las uniones predominantes en éstas (Lapierre y cols. 1995), y cuya contribución puede variar entre un 50% en gimnospermas y el 80% en angiospermas (Ralph y cols. 2004). Por este motivo, la tioacidolisis solubiliza sólo la fracción de lignina no condensada (Anterola y Lewis 2002), localizada principalmente en las paredes celulares secundarias (Ruel y cols. 2002). Los productos de degradación de las ligninas permiten la identificación de las unidades que constituyen la fracción no condensada de las mismas. Entre esos productos derivados se encuentran los procedentes de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico que

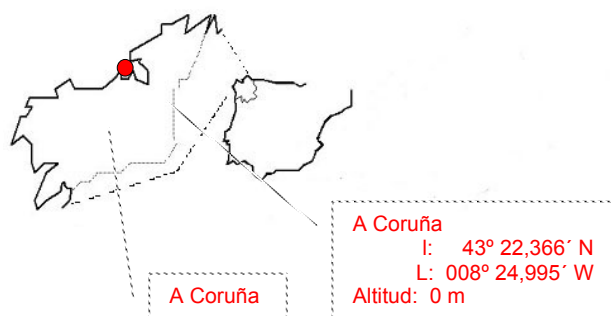
dan lugar a las tres unidades constituyentes de las ligninas más importantes: H (hidroxifenilo), G (guaiacilo) y S (siringilo).

La degradación de paredes con nitrobenceno produce mezclas características de *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído que son indicativas de los residuos de unidades H, G y S, respectivamente.

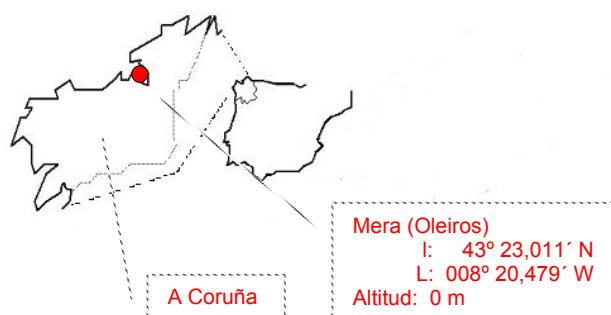
Las unidades H, derivadas de la incorporación del monolignol alcohol *p*-cumarílico a las ligninas, podría ser confundido con ésteres del *p*-cumarato que aparecen como grupos acilados laterales en las ligninas de los cereales. Esta confusión (y la derivación de productos idénticos cuando se usan métodos degradativos como la oxidación con nitrobenceno) condujeron en el pasado a la sobreestimación de los niveles de unidades H (Boerjean 2003).

Algas

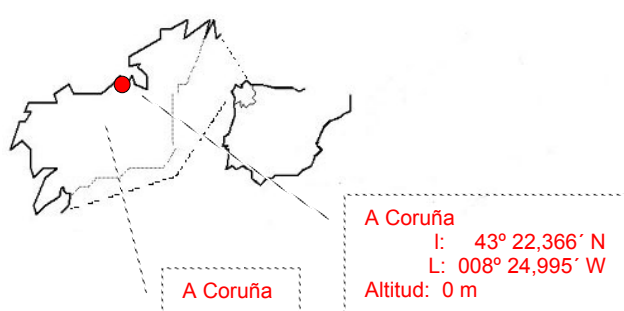
Mastocarpus stellatus Petrocelidaceae
RHODOPHYTA



Cystoseira baccata Cystoseiraceae
OCHROPHYTA



Ulva rigida Ulvaceae
CHLOROPHYTA



Los resultados obtenidos en la tioacidólisis de las paredes celulares de las tres algas estudiadas (*Mastocarpus stellatus*, *Cystoseira baccata* y *Ulva rigida*) fueron totalmente negativos. En la cromatografía de gases no fue detectado ninguno de los productos de tioacidólisis que definen a las ligninas (Lapierre y cols. 1995), ni siquiera - y fundamentalmente - los más abundantes, derivados de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 3.7). Mientras que la oxidación por nitrobenzeno permitió detectar pequeñas cantidades de *p*-hidroxibenzaldehído, que permitirían aventurar la presencia de grupos H procedentes de la degradación de las ligninas (Figura 3.8).

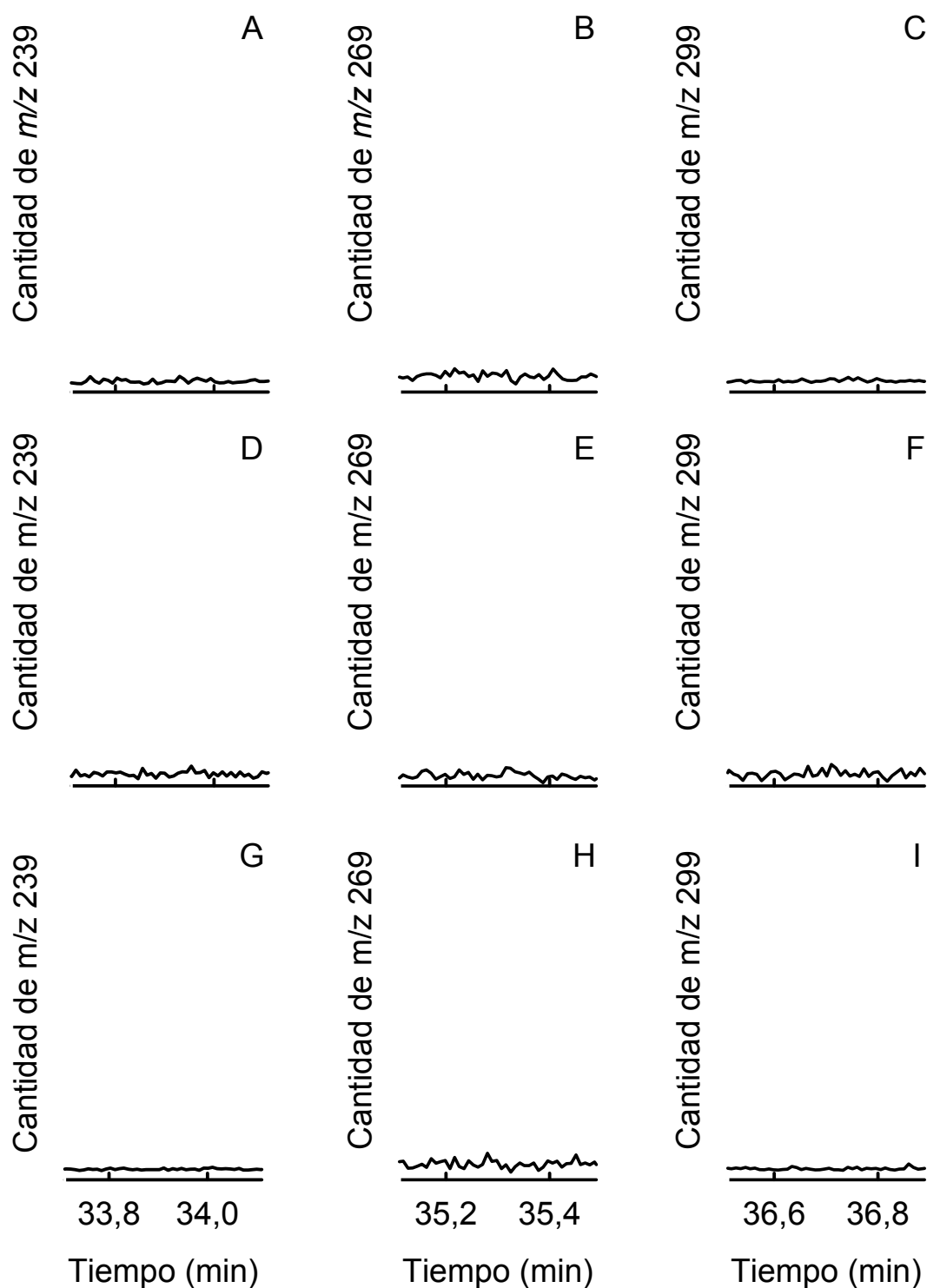


Figura 3.7. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A, D y G), coniferílico (B, E y H) y sinapílico (C, F e I), en las ligninas del xilema de *Mastocarpus stellatus* (A, B y C), *Cystoseira baccata* (D, E y F) y *Ulva rigida* (G, H e I).

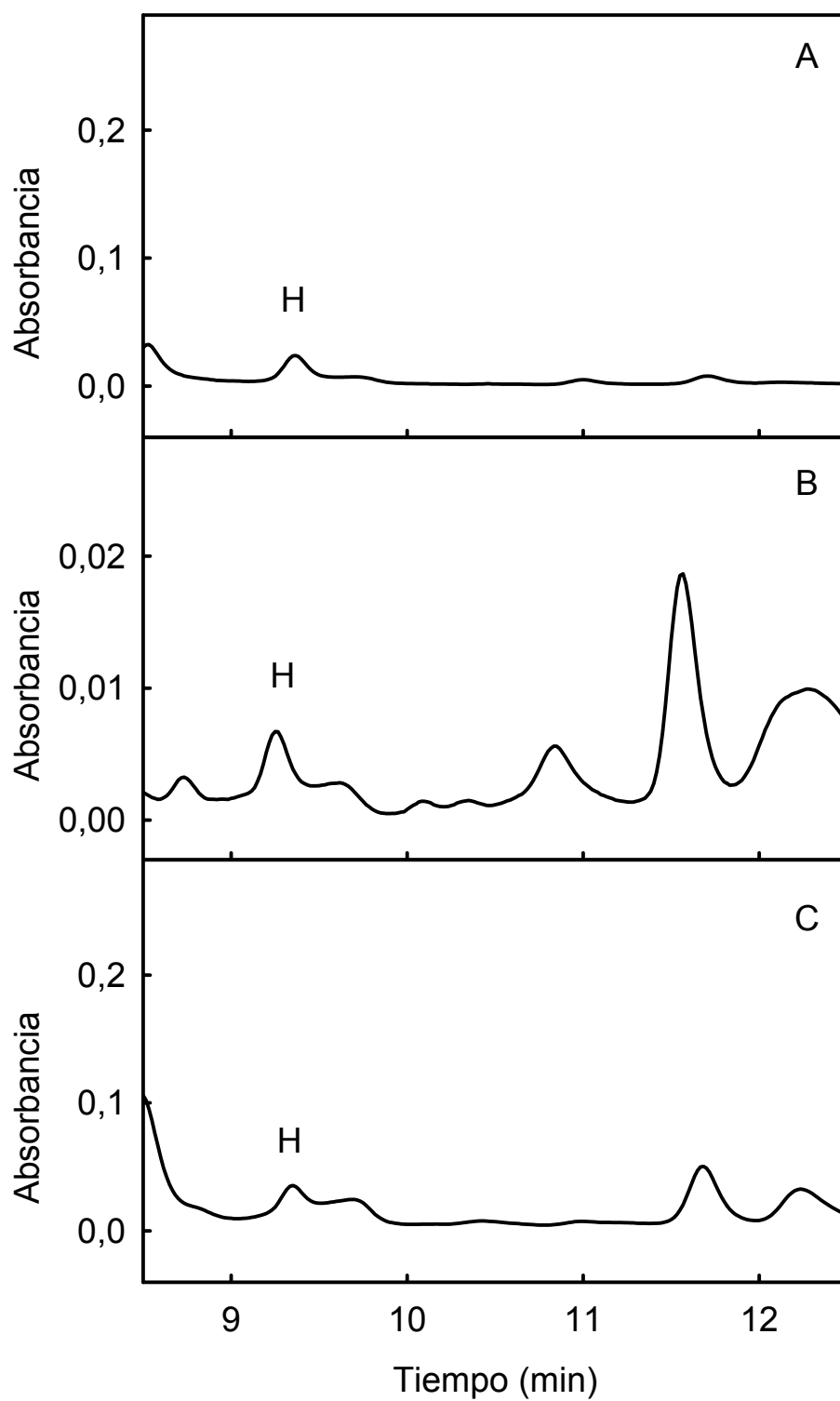
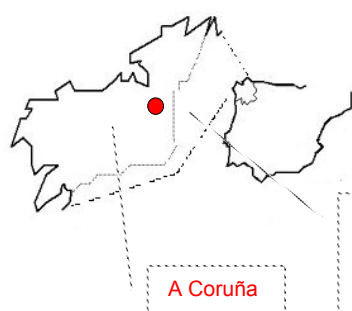


Figura 3.8. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobencono obtenidos de las paredes celulares de *Mastocarpus setellatus* (A), *Cystoseira baccata* (B) y *Ulva rigida* (C), mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H).

Plantas terrestres basales

Marchantia polymorpha Marchantiaceae
HEPATOPHYTA



O Carballo (Oleiros)
I: 43° 19,383' N
L: 008° 20,690' W
Altitud: 30 m

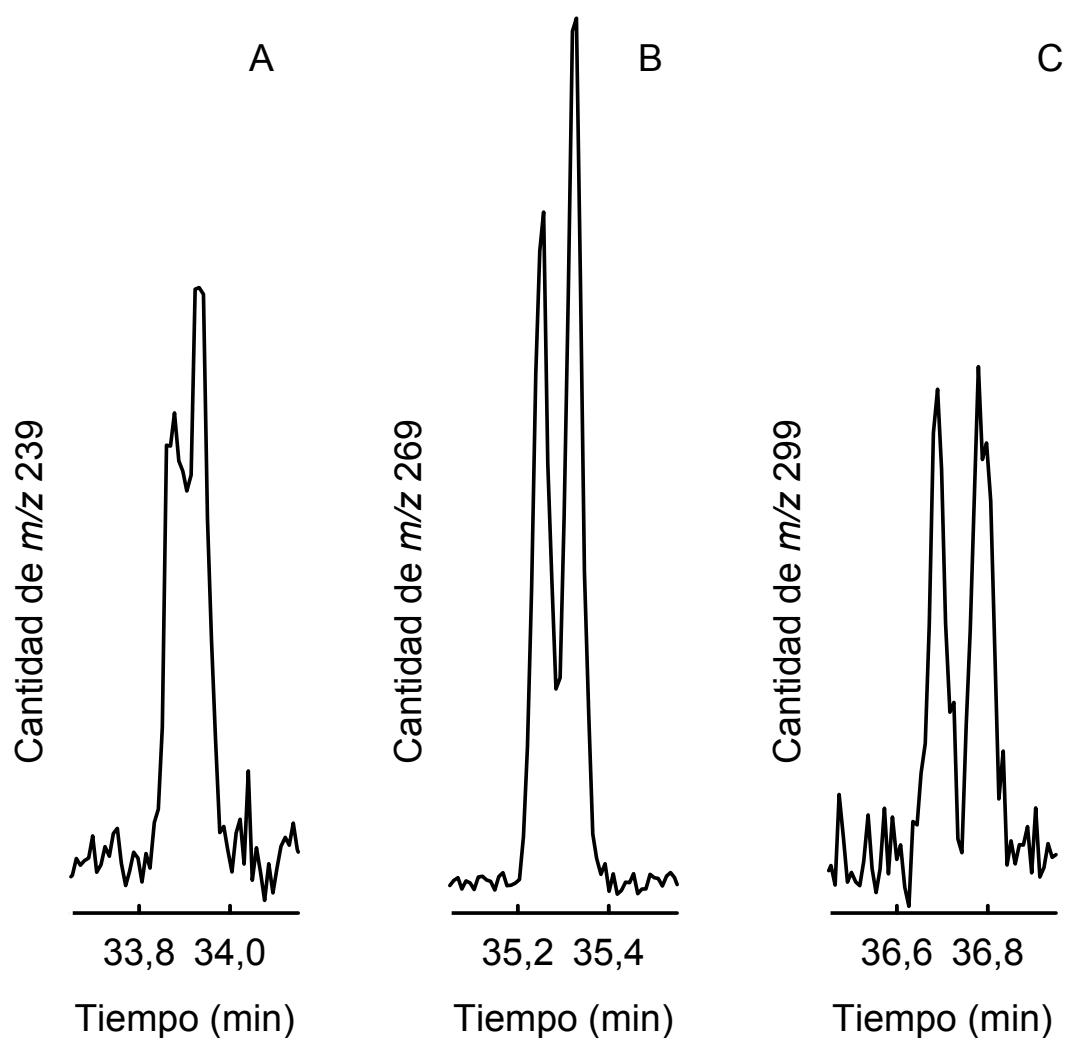


Figura 3.9. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Marchantia polymorpha*.

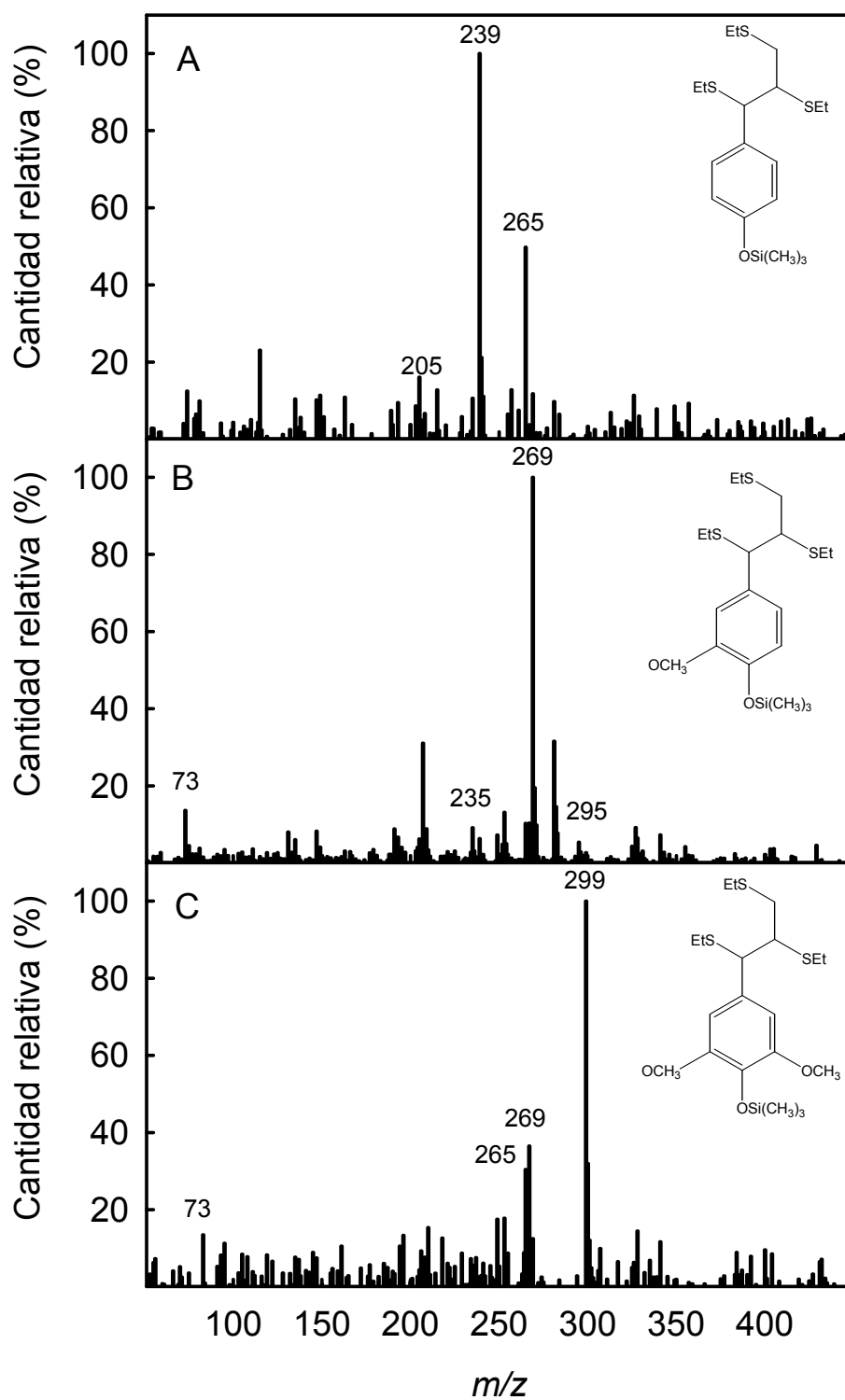
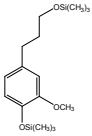
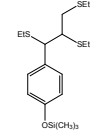
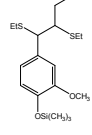
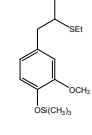
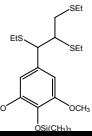


Figura 3.10. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Marchantia polymorpha*.

Tabla 3.2. Productos de tioacidolisis del xilema de *Marchantia polymorpha*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	22,2	326(25), 311(11), 267(100), 236(44), 221(30), 209(2), 206(78), 179(10)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	33,9	265(50), 239(100), 205(16)	Alcohol <i>p</i> -cumarílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	35,2	418(1), 403(4), 295(11), 269(100), 235(13), 75(7), 73(18)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	35,4	283(66), 222(48), 192(4), 135(100)	Coniferilaldehído unido por enlaces β -O-4
	36,8	325(5), 299(100), 269(13), 265(30), 239(3), 75(4)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)

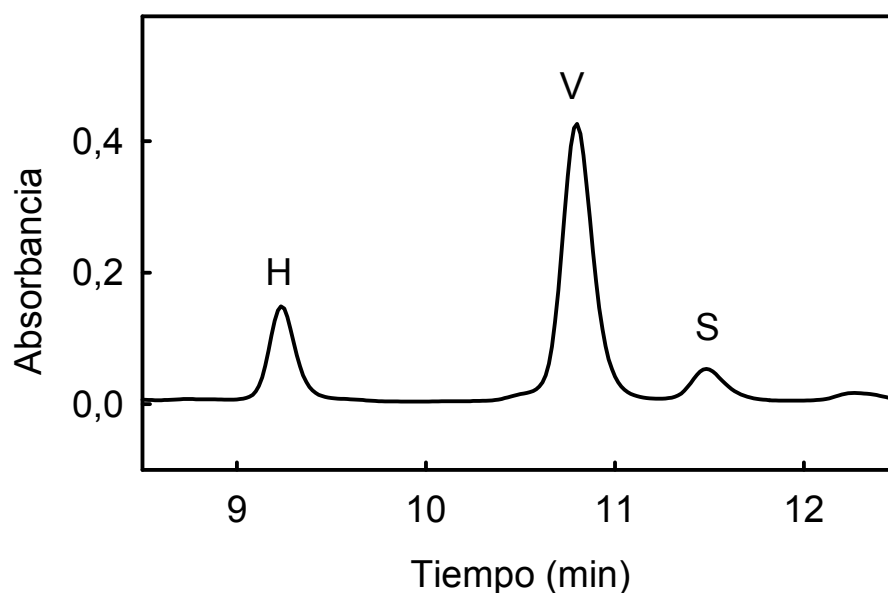


Figura 3.11. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzено obtenidos de las paredes celulares de *Marchantia polymorpha*, mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanillina (V) y siringaldehído (S).

Los productos de tioacidolisis de *Marchantia polymorpha* (Tabla 3.2), una hepática, y, por lo tanto, planta basal terrestre perteneciente al grupo de las primeras colonizadoras de este medio, incluyen residuos procedentes de la degradación de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figuras 3.10 y 3.11), estos últimos en cantidades traza y los primeros en pequeña proporción (Tabla 3.12).

Además de los tres alcoholes citados, procedentes de la rotura de enlaces β -O-4 de la fracción lineal de las ligninas, *Marchantia polymorpha* presenta también, procedentes de la degradación del mismo tipo de enlaces, residuos de coniferilaldehído y, procedentes de la degradación de enlaces O-4-terminales, restos de alcohol dihidroconiferílico, todos en cantidades traza (Tabla 3.12).

Los resultados obtenidos por oxidación con nitrobenzeno (Tabla 3.10) confirman los resultados de tioacidolisis. Fueron detectados restos de *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído (Figura 3.11).

El hecho de que una hepática contenga grupos S, aunque sea en cantidades traza es relevante y a considerar.

Physcomitrella patens

Funariaceae

BRYOPHYTA

Proporcionado por el Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid y obtenido en condiciones estériles como describen en Benito y Rodríguez-Navarro (2003).



El musgo *Physcomitrella patens*, planta basal terrestre, no presenta estructuras derivadas de las ligninas tras la degradación de paredes por tioacidolisis (Tabla 3.12). Ni siquiera de las procedentes de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 3.9).

Los resultados obtenidos de la oxidación alcalina con nitrobenzeno reflejan la ausencia de vanillina y de siringaldehído pero presentan *p*-hidroxibenzaldehído (Figura 3.12), aunque en cantidades muy pequeñas (Tabla 3.13).

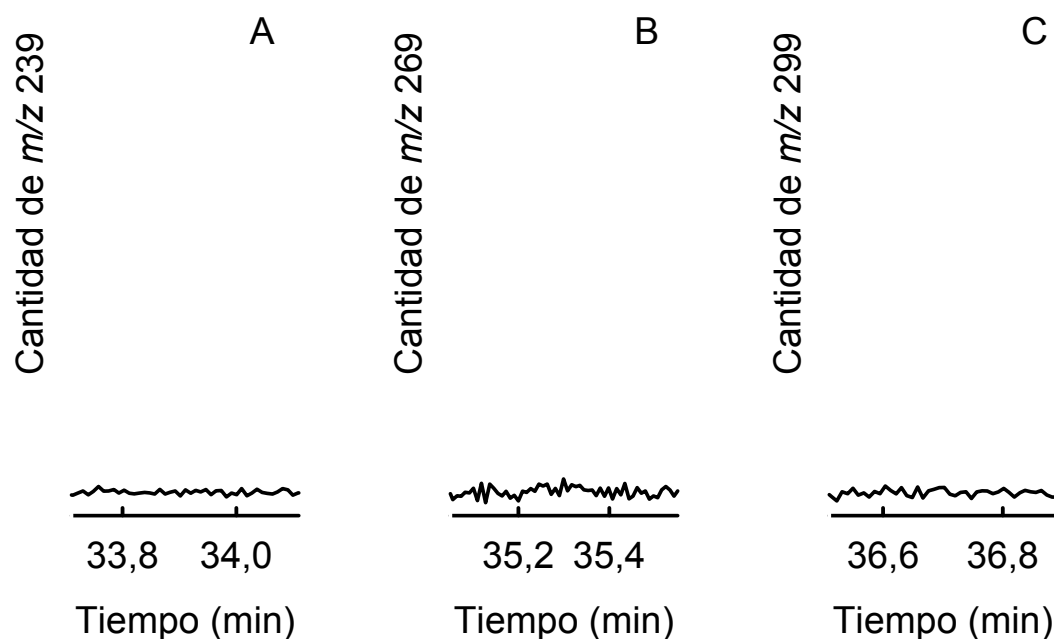


Figura 3.12. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Physcomitrella patens*.

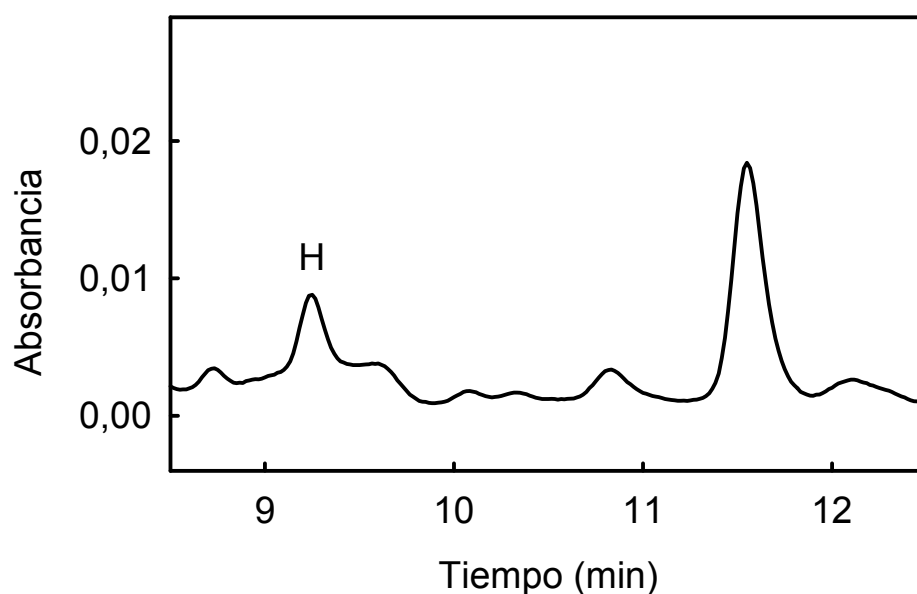


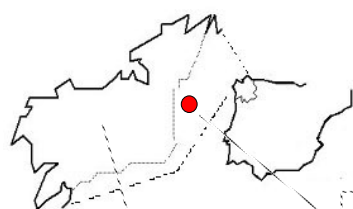
Figura 3.13. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzono obtenidos de las paredes celulares de *Physcomitrella patens*, mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H).

Licófitos

Isoetes fluitans

Isoetaceae

PTERIDOPHYTA



Guitiriz
 I: 43° 11,247' N
 L: 007° 53,392' W
 Altitud: 453 m

A Coruña

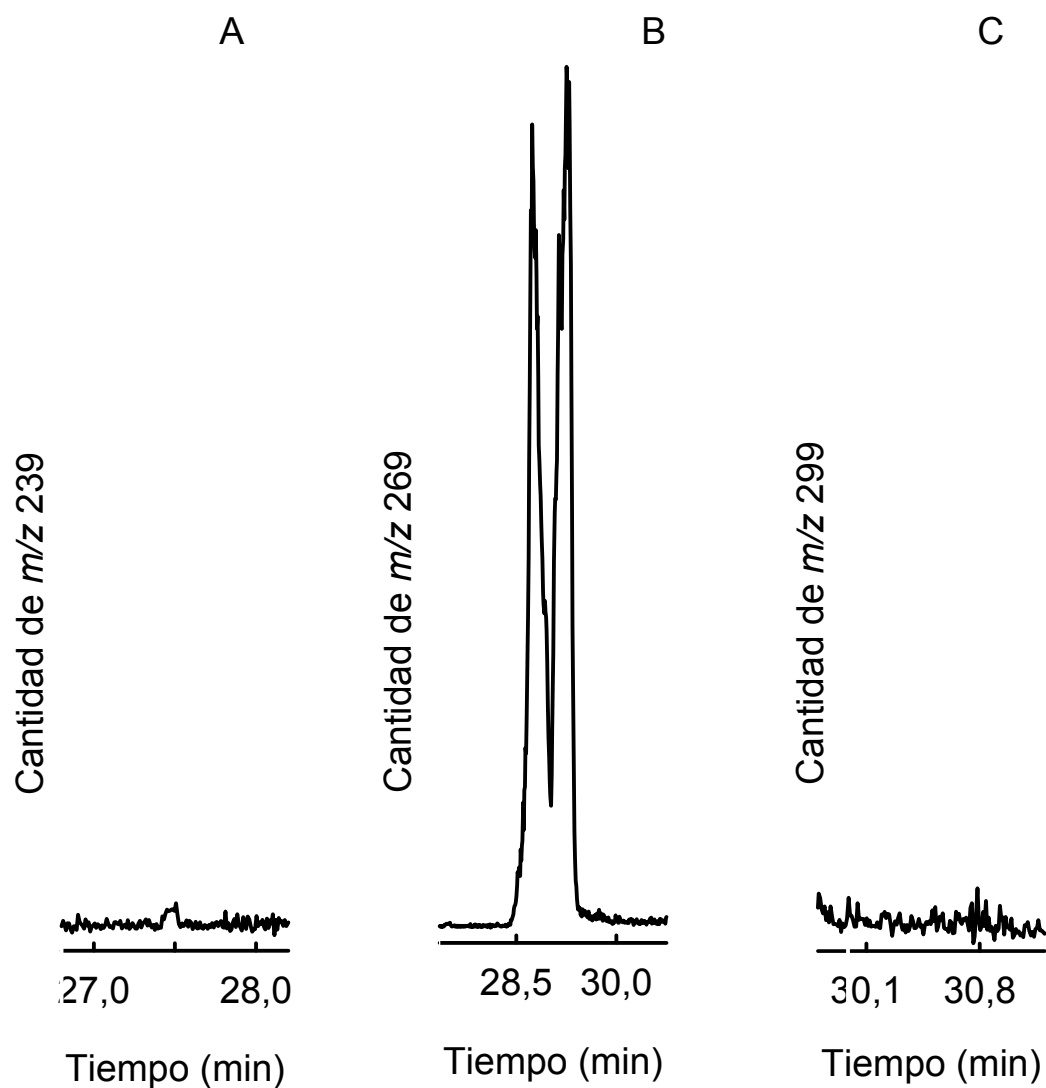


Figura 3.14. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Isoetes fluitans*.

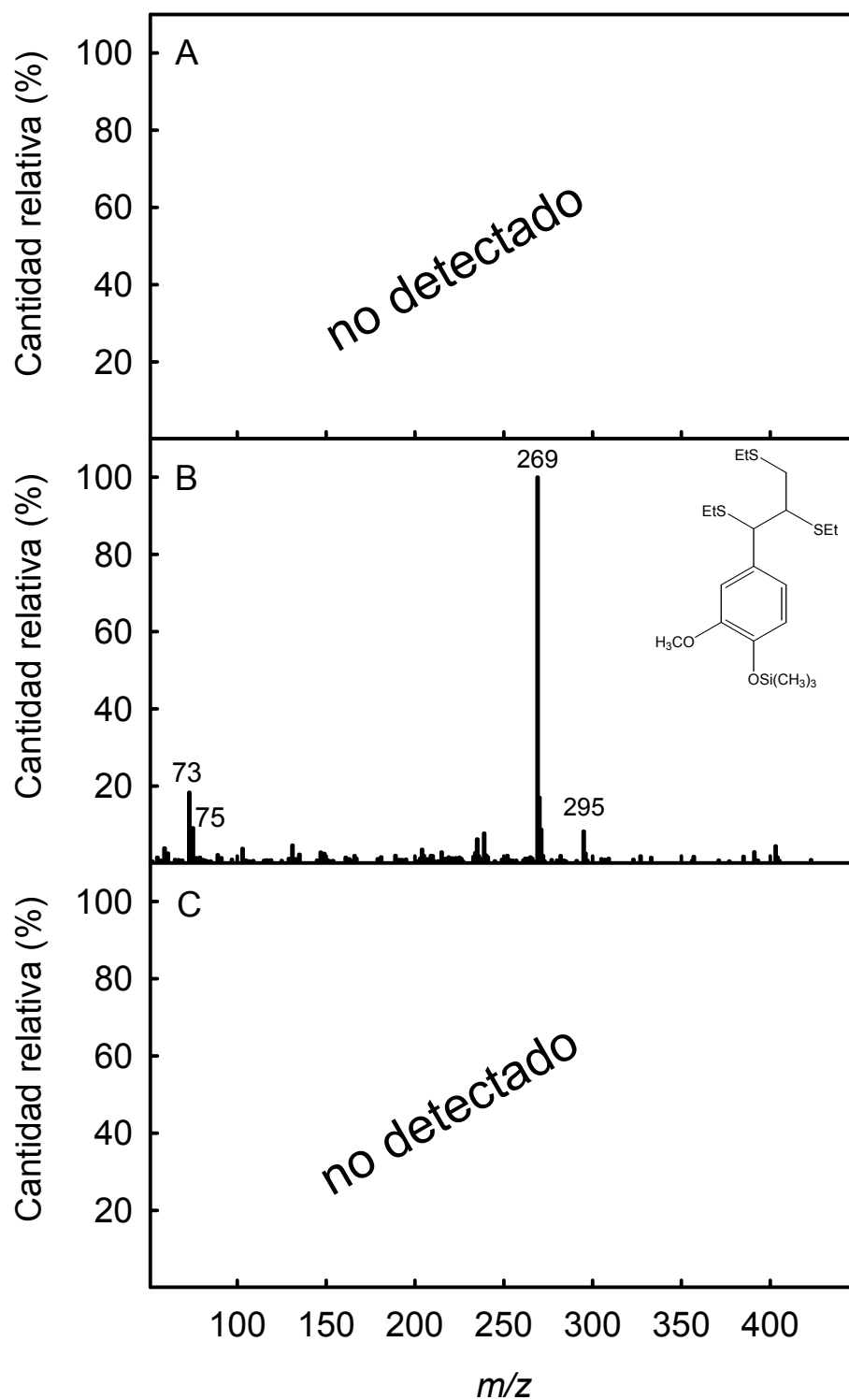
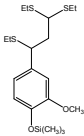
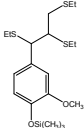


Figura 3.15. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Isoetes fluitans*.

Tabla 3.3. Productos de tioacidólisis del xilema de *Isoetes fluitans*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidólisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	26,52	418(11), 403(11), 357(16), 356(44), 327(16), 295(10), 269(100), 265(13), 135(7)	Aldehído coniferílico O-4-terminal
	28,74	403(4), 295(8), 269(100), 235(6), 75(9), 73(18)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4

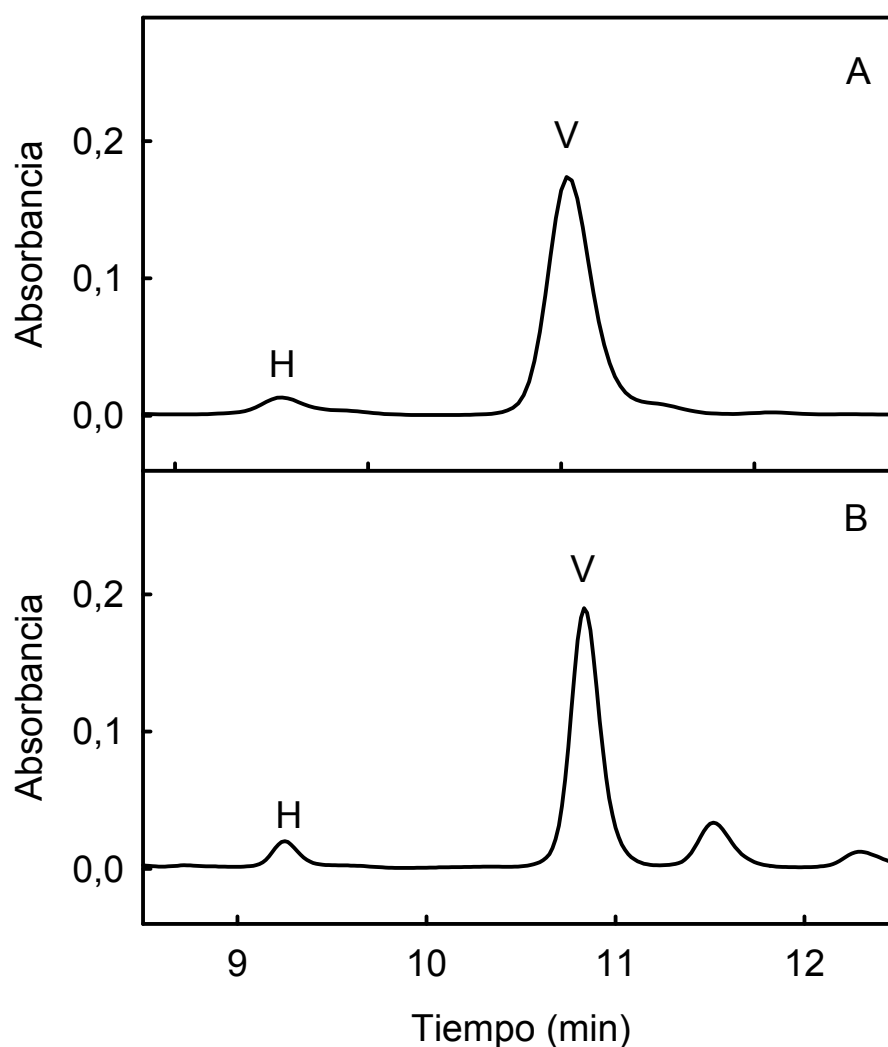
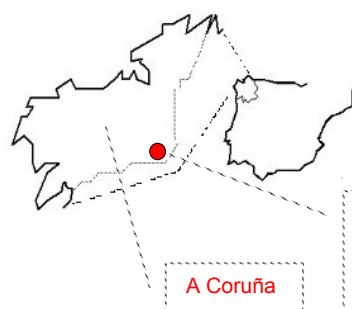


Figura 3.16. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzono obtenidos de las paredes celulares de *Isoetes fluitans* (A) e *Isoetes hystrix* (B), mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanillina (V).

Isoetes histrix

Isoetaceae

PTERIDOPHYTA



A Coruña

Melide

I: 42° 53,978' N

L: 007° 58,605' W

Altitud: 449 m

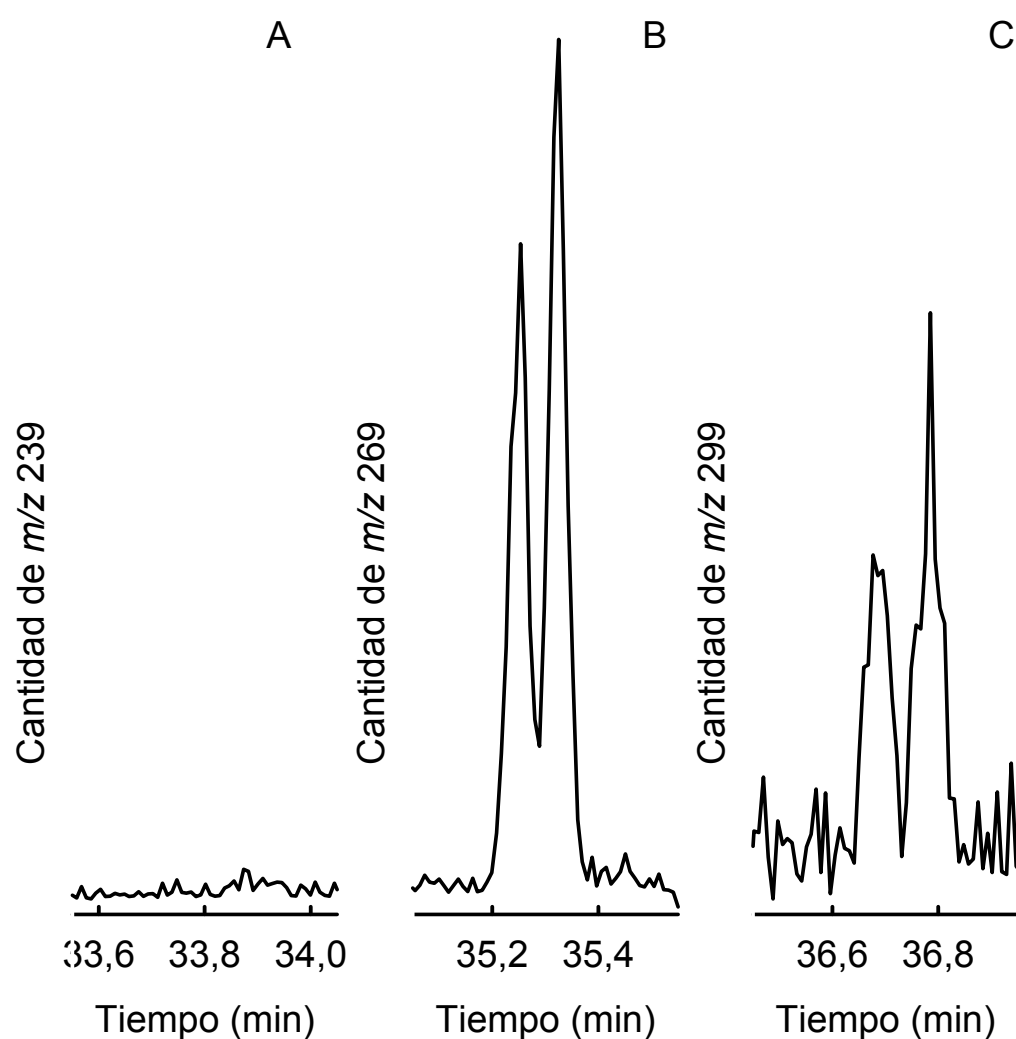


Figura 3.17. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Isoetes histrix*.

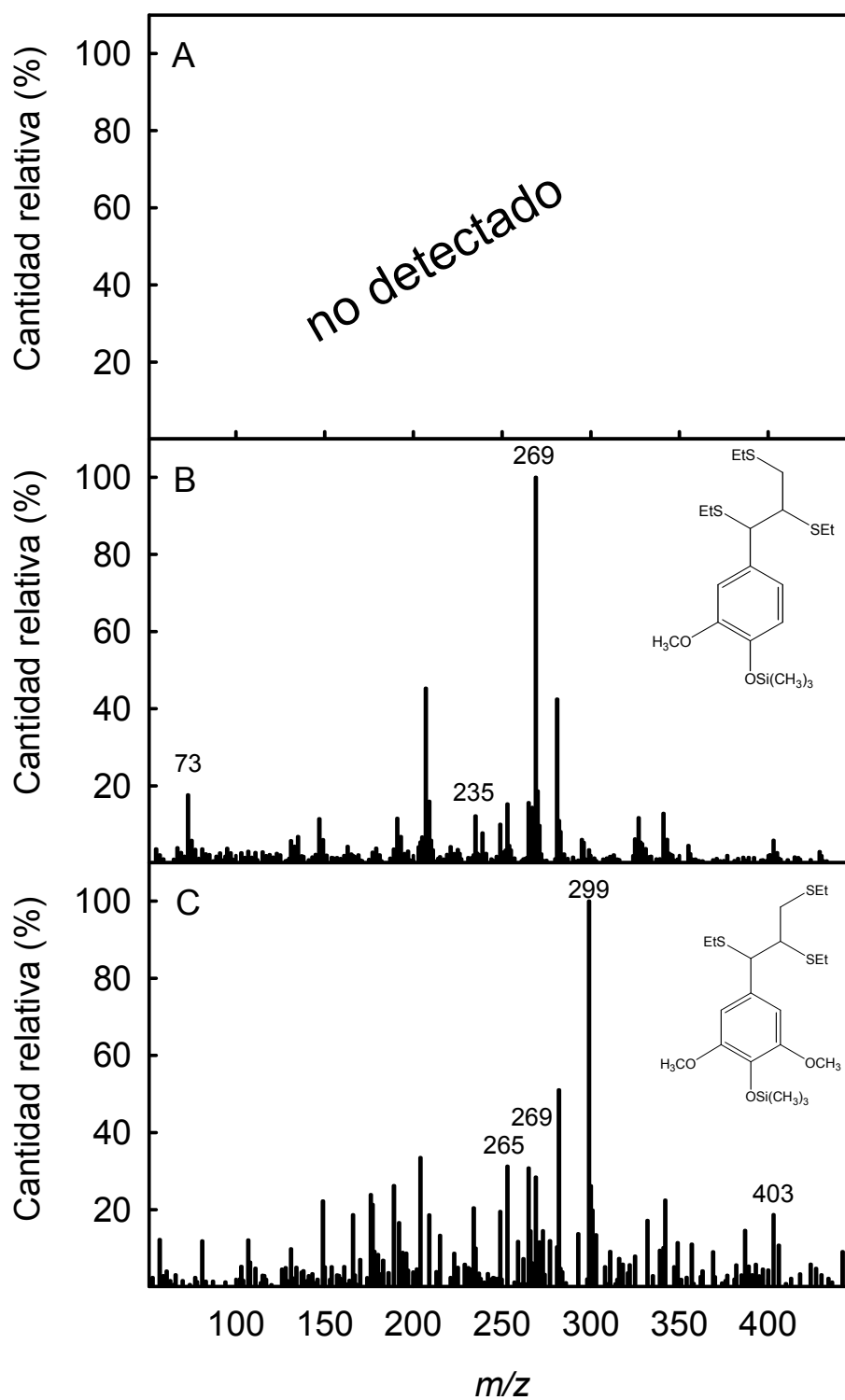
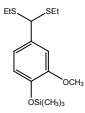
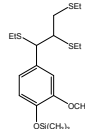
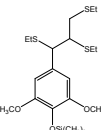
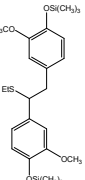


Figura 3.18. Espectros de masas de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Isoetes histrix*.

Tabla 3.4. Productos de tioacidolisis del xilema de *Isoetes histrix*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	27,4	269(100), 73(46)	Vanillina O-4-terminal
	35,2	418(1), 403(6), 295(6), 269(100), 235(12), 75(6), 73(18)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	36,8	448(2), 403(19), 325(8), 299(100), 269(28), 265(31)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	37,9	417(5), 269(100), 73(61)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

En *Isoetes fluitans*, un licopodio acuático, se han encontrado los productos de tioacidolisis resultantes de la rotura de enlaces β -O-4 de las ligninas, procedentes del alcohol coniferílico (Figuras 3.14 y 3.15) y de la rotura de los enlaces O-4-terminales procedentes de coniferilaldehído (Tabla 3.3), ambos en cantidades importantes (Tabla 3.12).

Los resultados obtenidos por medio de la degradación con nitrobencono (Figura 3.20) muestran la importante presencia de vanillina, que corroboraría los resultados de tioacidolisis, y una menor cantidad de *p*-hidroxibenzaldehído (Tabla 3.14).

Isoetes histrix es un licopodio del mismo género que *Isoetes fluitans* pero que presenta diferencias en cuanto a los productos de degradación obtenidos por tioacidolisis (Tabla 3.4). No solo aparecieron unidades de los alcoholes coniferílico y sinapílico procedentes de la rotura de enlaces β -O-4 (Figuras 3.17 y 3.18), sino también restos procedentes de enlaces O-4-terminales en los que participaban la vanillina, y del estilbeno.

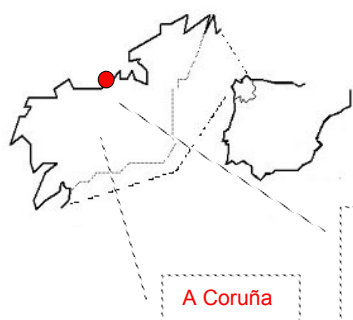
La oxidación con nitrobencono proporcionó resultados similares en las dos especies de *Isoetes* (Figura 3.16). En ambas se detectó *p*-hidroxibenzaldehído y vanillina, pero en ninguna siringaldehído como podría ser esperado, en el caso de *Isoetes histrix*, de los resultados de tioacidolisis.

Esfenófitos

Equisetum telmateia

Equisetaceae

PTERIDOPHYTA



Sabón (Arteixo)
 I: 43° 19,417' N
 L: 008° 29,911' W
 Altitud: 26 m

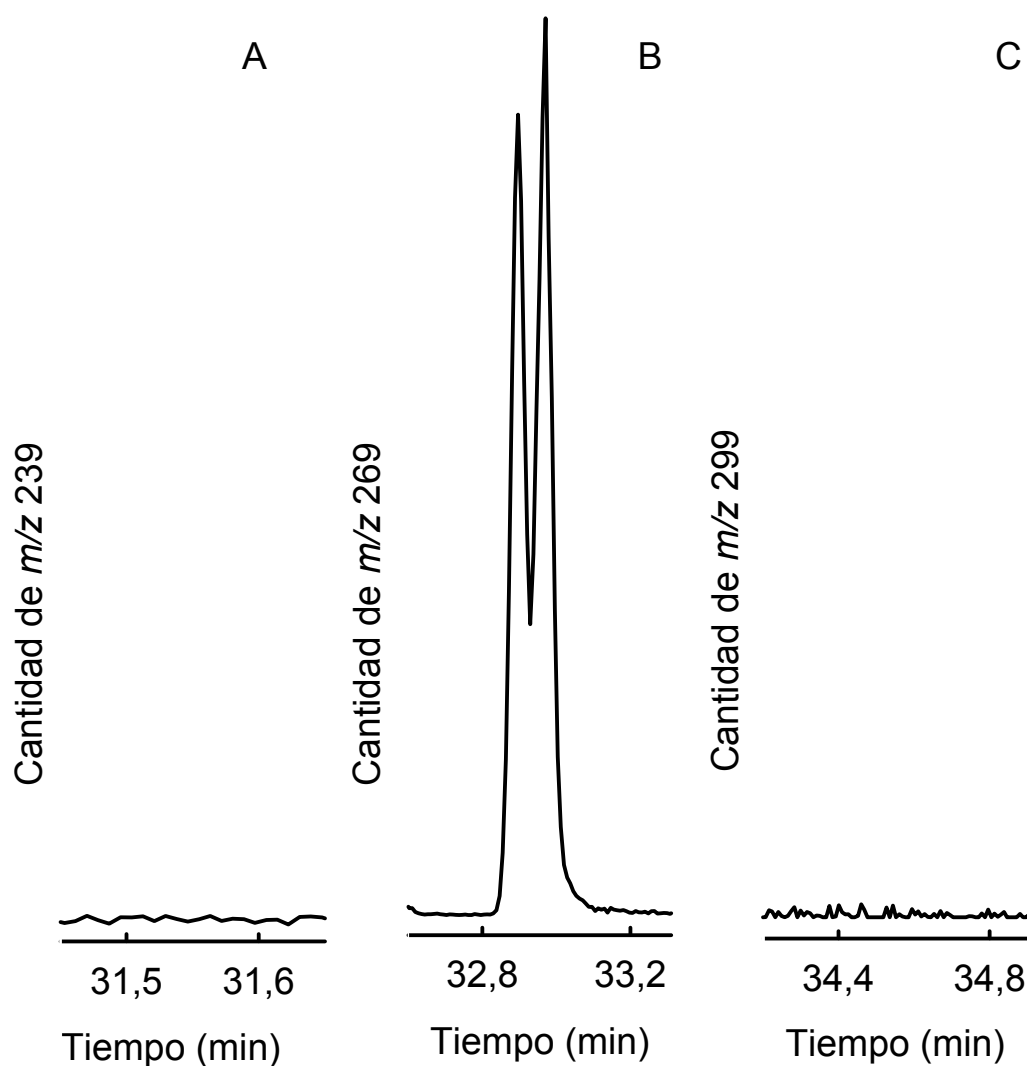


Figura 3.19. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Equisetum telmateia*.

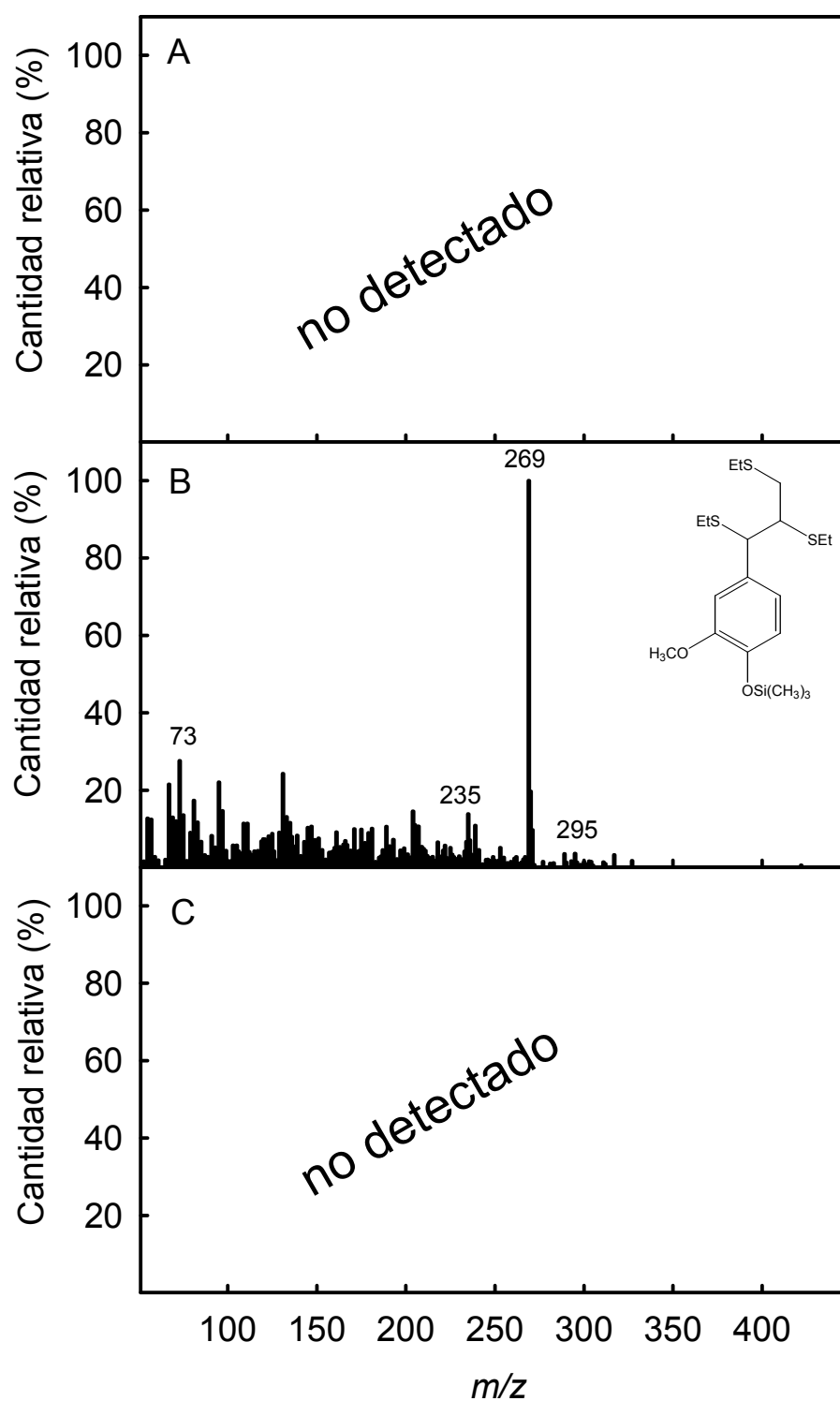
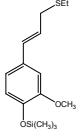
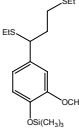
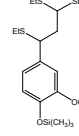
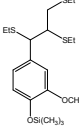


Figura 3.20. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Equisetum telmateia*.

Tabla 3.5. Productos de tioacidolisis del xilema de *Equisetum telmateia*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	25,0	296(2), 281(22), 235(100), 204(52), 131(65), 75(5), 73()	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	28,2	297(41), 235(55), 209(4), 205(57), 81(100), 75(27), 73()	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	32,6	356(2), 295(8), 269(100), 239(17), 135(10), 73(2)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	32,9	295(4), 269(100), 235(13), 75(13), 73(27)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)

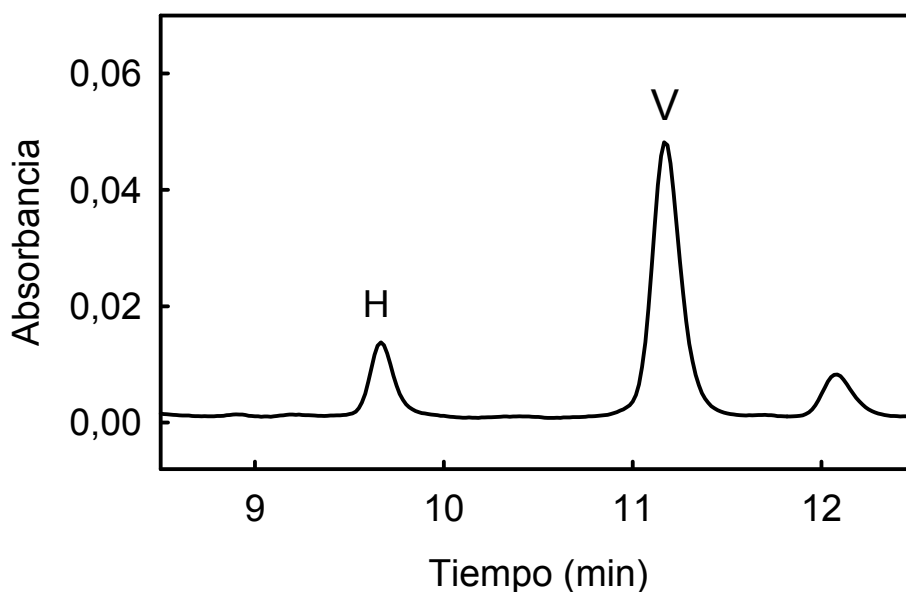


Figura 3.21. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzono obtenidos de las paredes celulares de *Equisetum telmateia*, mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanillina (V).

La tioacidolisis de las paredes del esfenófito *Equisetum telmateia* reveló la presencia de residuos de alcohol coniferílico procedentes de la degradación de enlaces β-O-4 (Figuras 3.19 y 3.20) y también alcohol coniferílico y coniferilaldehído procedentes de la rotura de los enlaces O-4-terminales (Tabla 3.5).

Como productos de la degradación alcalina con nitrobenzono se obtuvieron *p*-hidroxibenzaldehído y vanillina (Figura 3.21).

Filicófitos

Ceratopteris thalictroides Parkeriaceae
PTERIDOPHYTA

Adquirido en Don Perro, un establecimiento especializado en plantas de acuario en A Coruña.

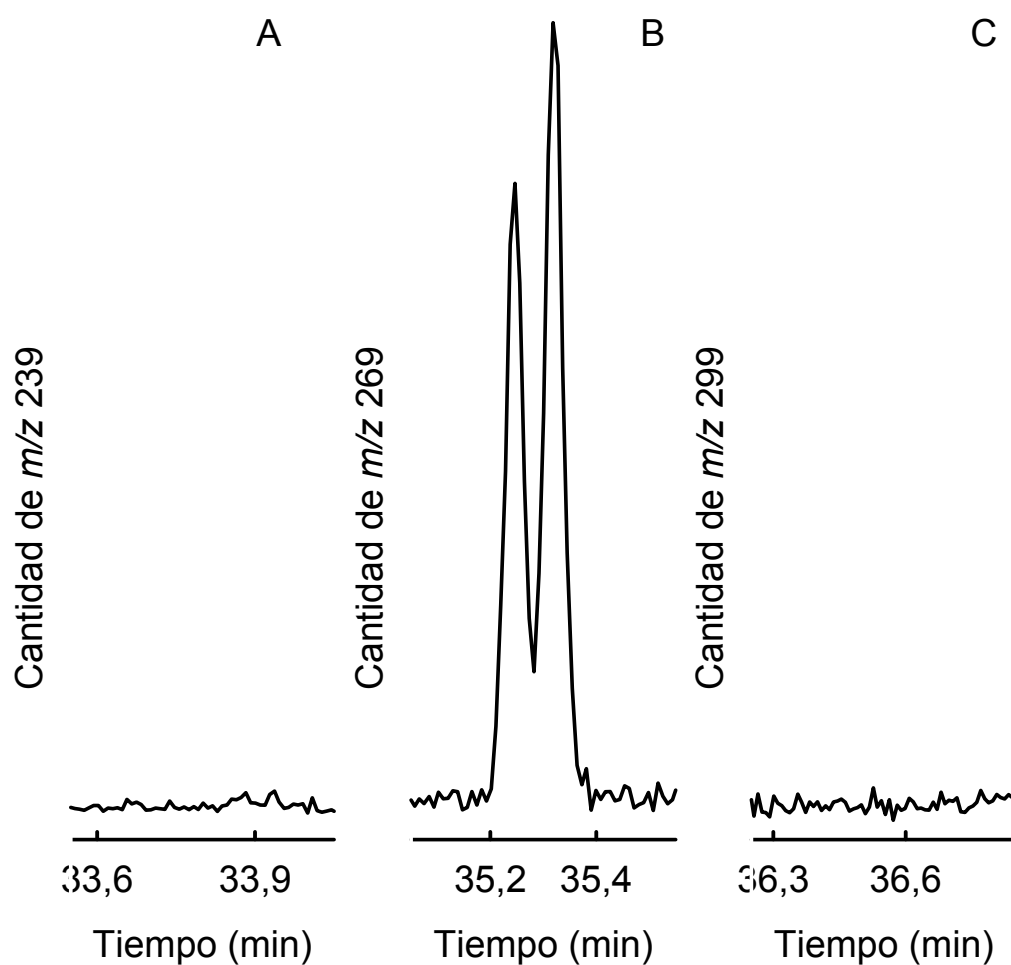


Figura 3.22. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Ceratopteris thalictroides*.

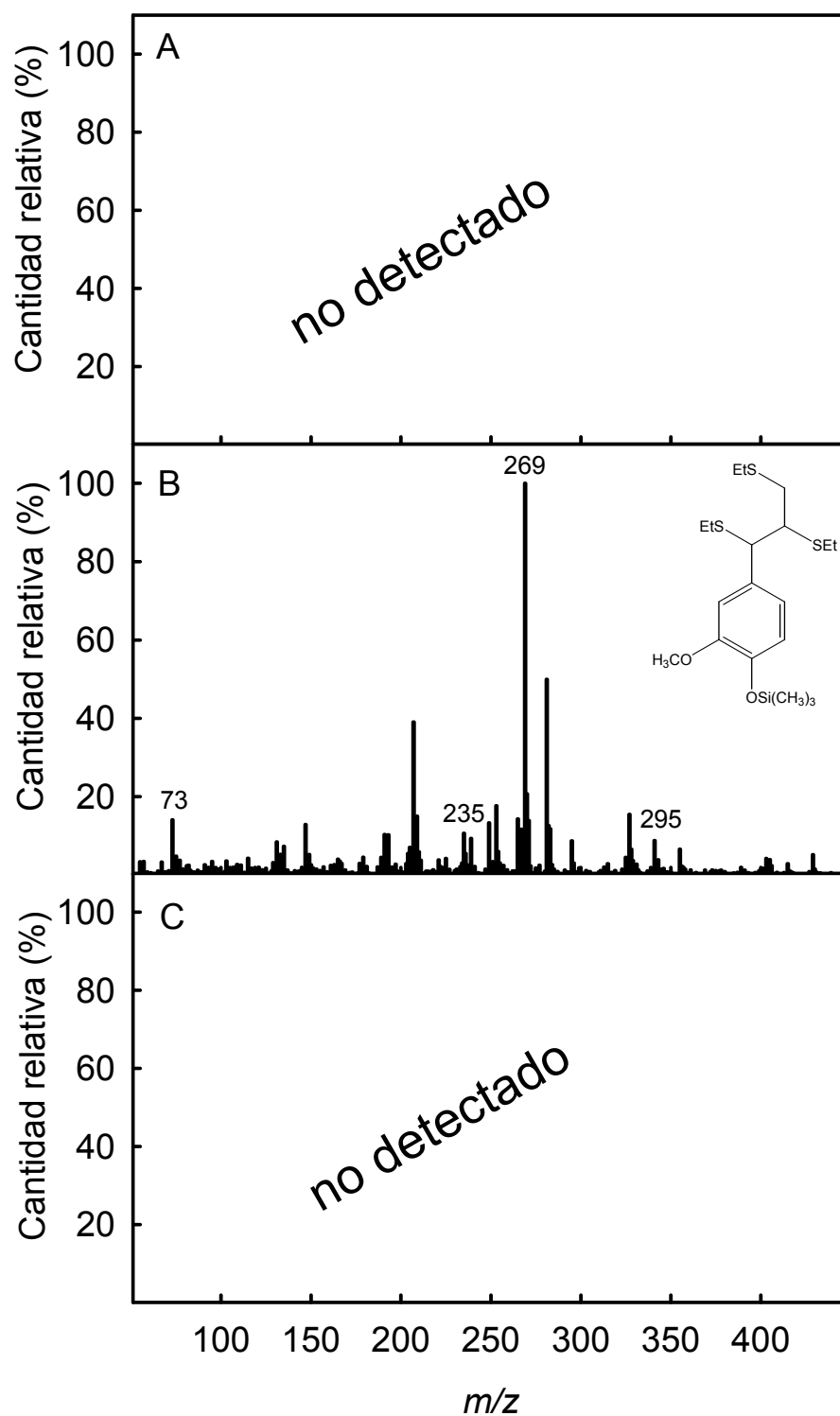
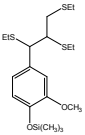
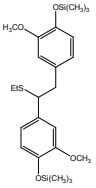


Figura 3.23. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Ceratopteris thalictroides*.

Tabla 3.6. Productos de tioacidólisis del xilema de *Ceratopteris thalictroides*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidólisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	35,2	418(1), 403(4), 295(9), 269(100), 235(11), 75(5), 73(14)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β -O-4 (eritro y treo)
	37,9	417(6), 269(100)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

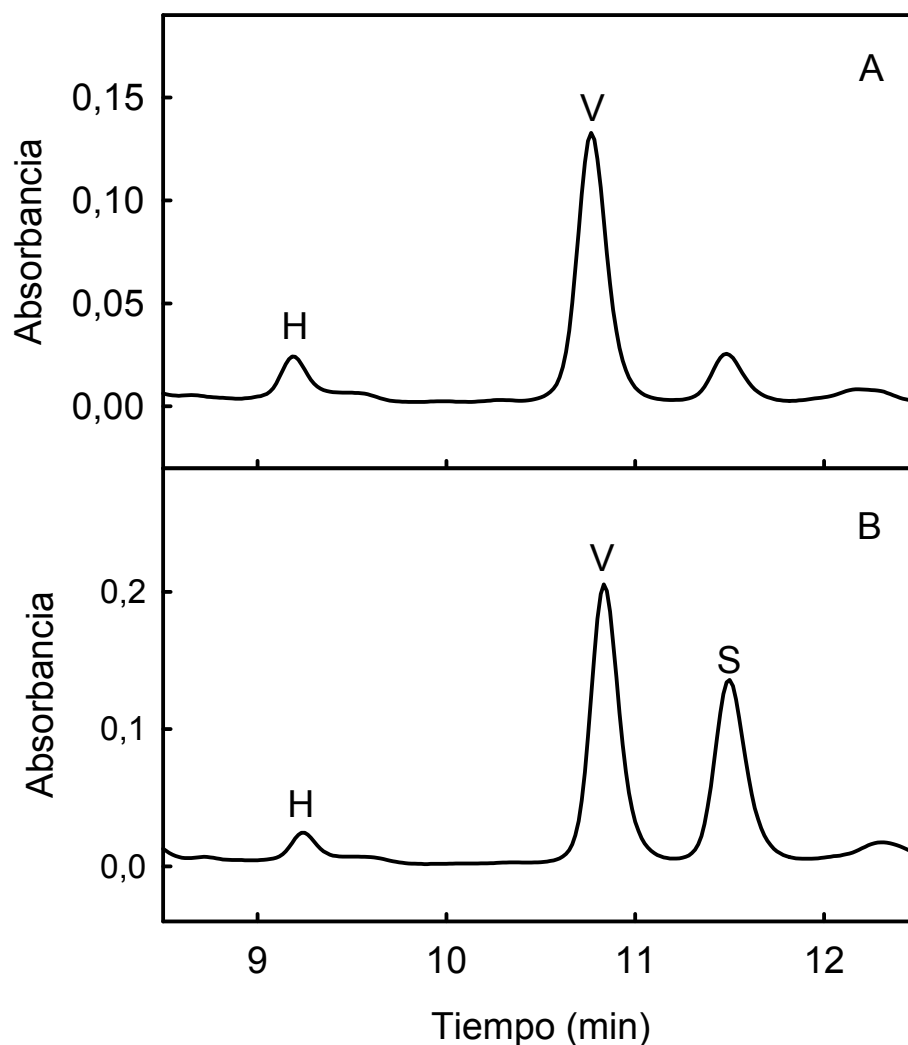


Figura 3.24. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzeno obtenidos de las paredes celulares de *Ceratopteris thalictroides* (A) y *C. cornuta* (B), mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanilina (V) y siringaldehído (S).

Ceratopteris cornuta Parkeriaceae
PTERIDOPHYTA

Adquirido en Don Perro, un establecimiento especializado en plantas de acuario en A Coruña.

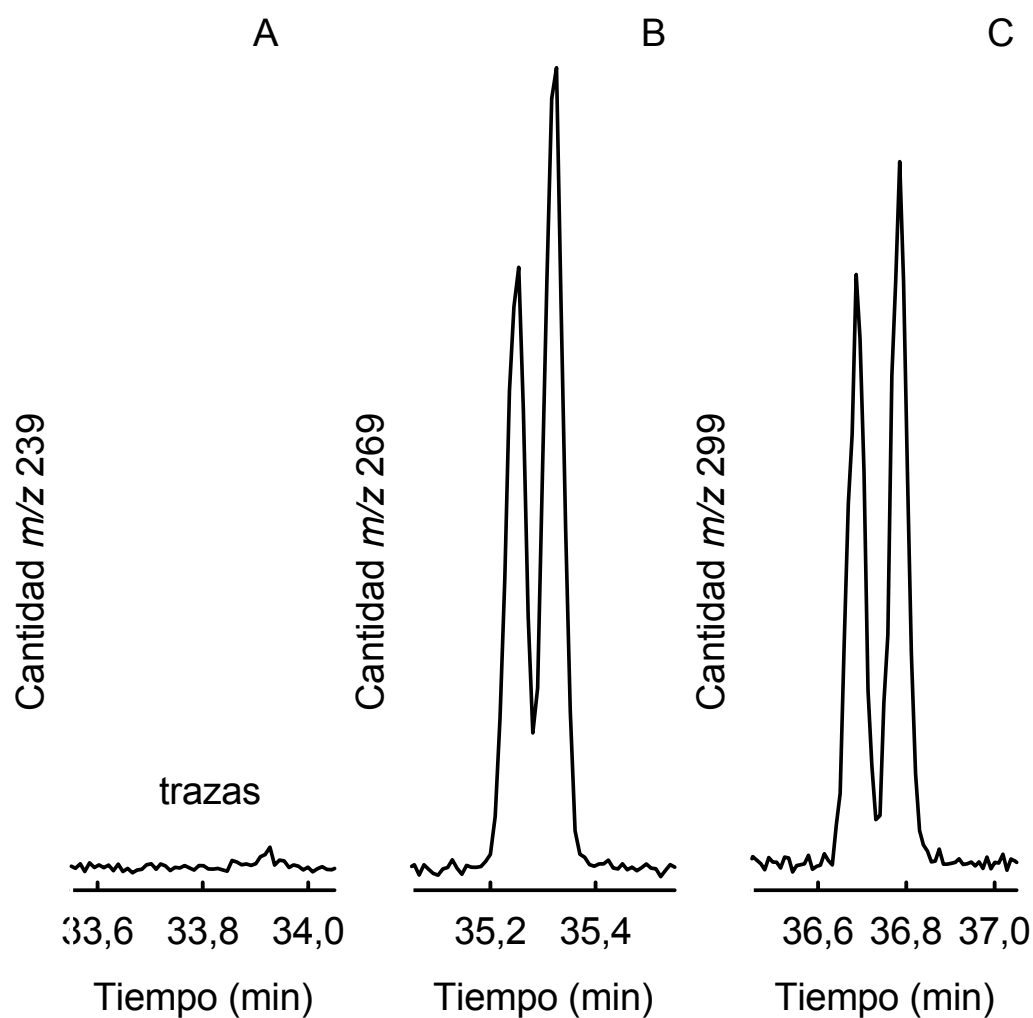


Figura 3.25. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Ceratopteris cornuta*.

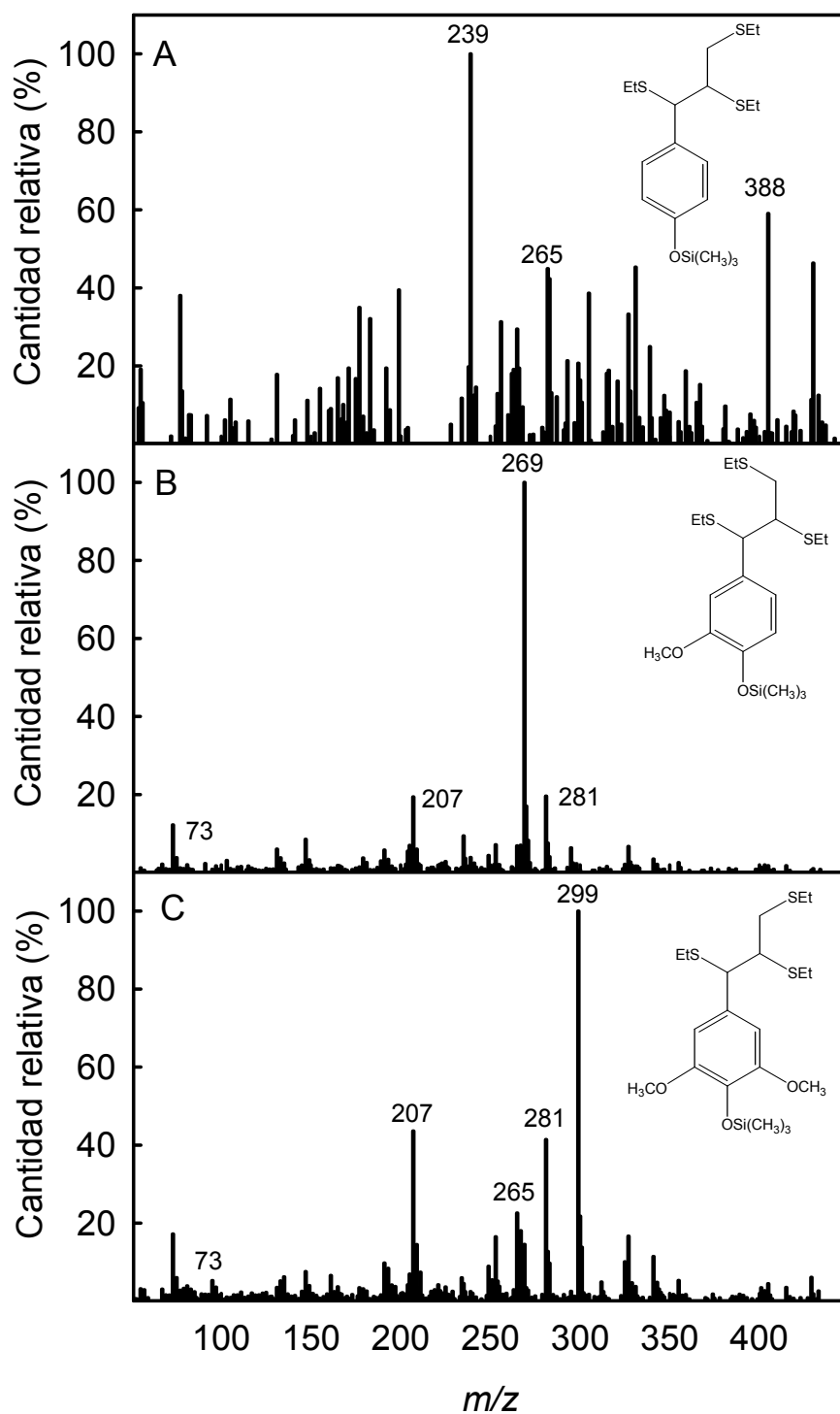
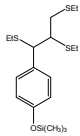
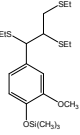
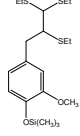
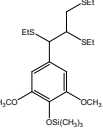
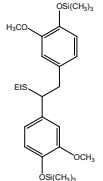
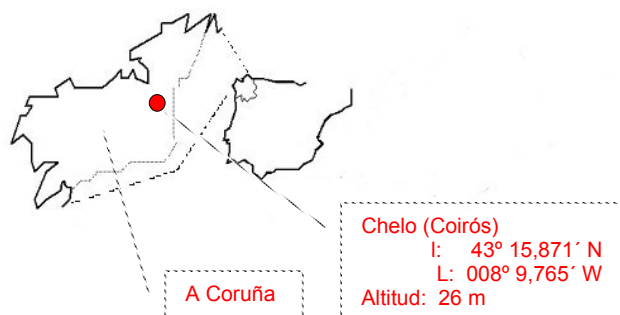


Figura 3.26. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes p -cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Ceratopteris cornuta*.

Tabla 3.7. Productos de tioacidolisis del xilema de *Ceratopteris cornuta*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	33,9	388(4), 265(29), 239(100)	Alcohol <i>p</i> -cumarílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	35,2	403(2), 295(6), 269(100), 235(9), 75(4), 73(12)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	35,4	283(100), 222(81), 192(13), 135(56), 73(36)	Coniferilaldehído unido por enlaces β -O-4
	36,8	403(3), 325(10), 299(100), 269(15), 265(23), 239(3), 75(6), 73(17)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	37,9	417(17), 269(100), 73(15)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

Phyllitis scolopendrium Aspleniaceae
PTERIDOPHYTA



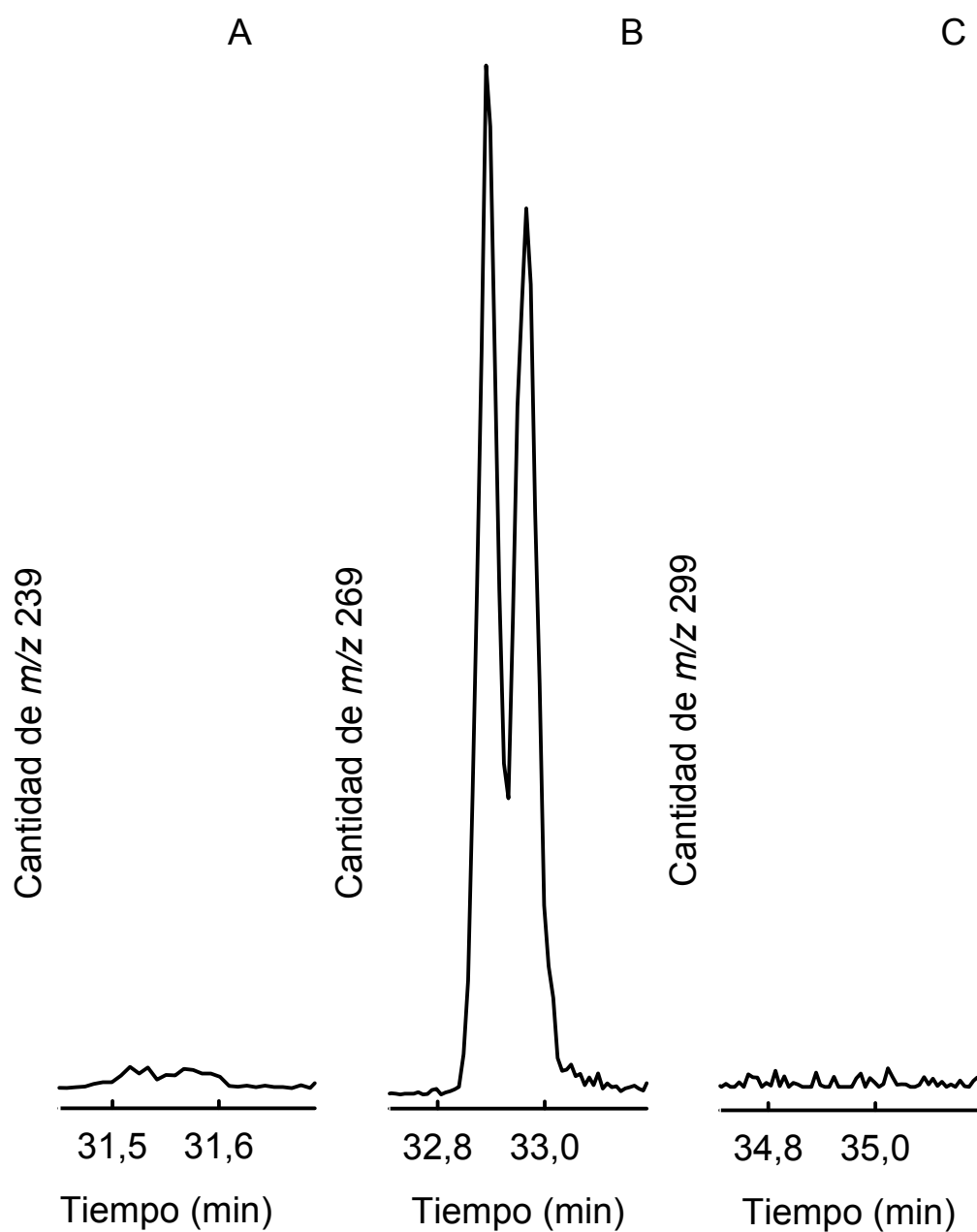


Figura 3.27. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Phyllitis scolopendrium*.

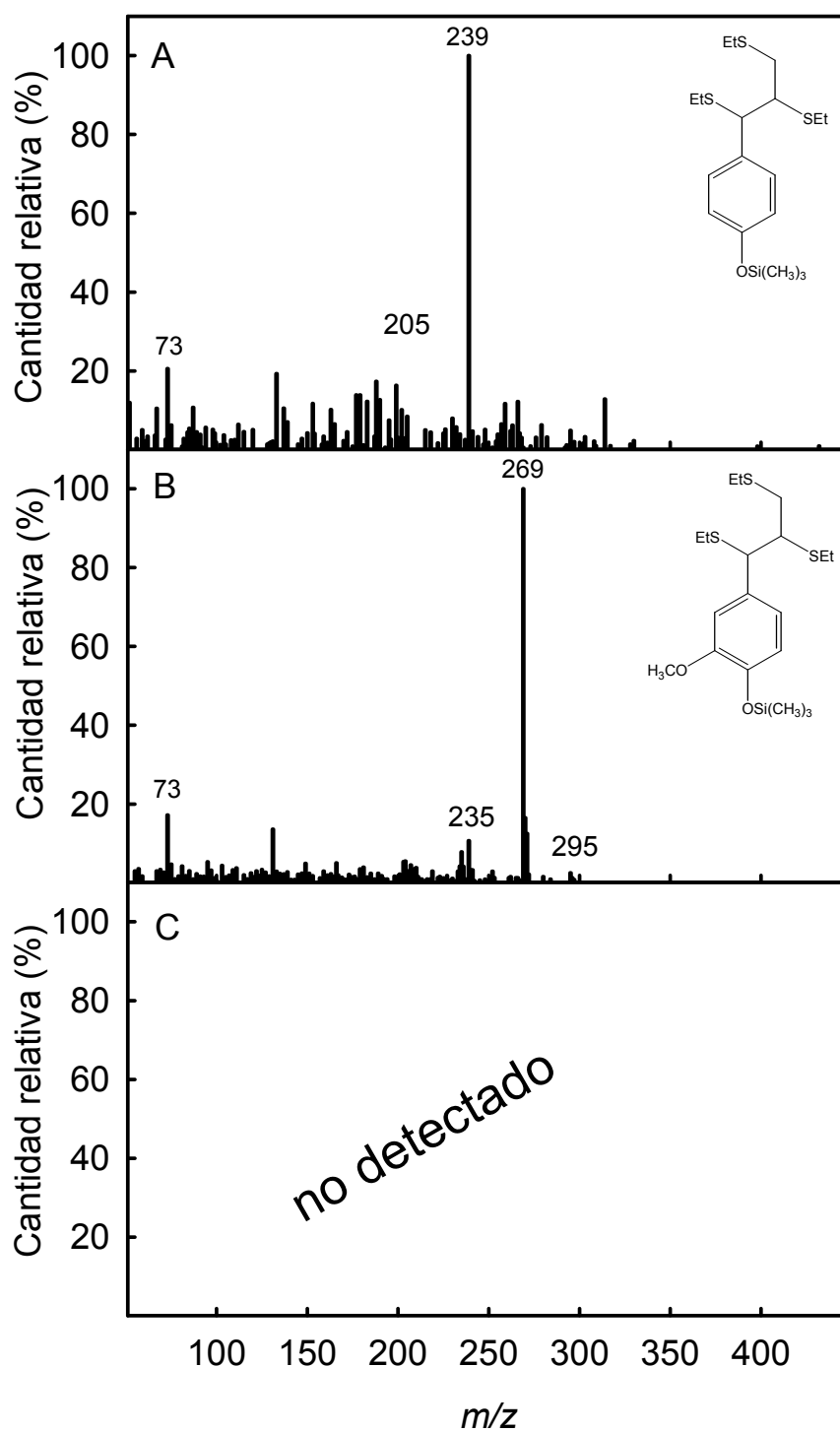
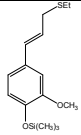
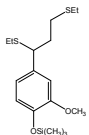
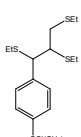
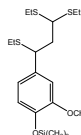
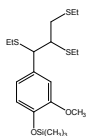
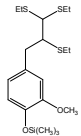
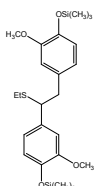


Figura 3.28. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes p -cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Phyllitis scolopendrium*.

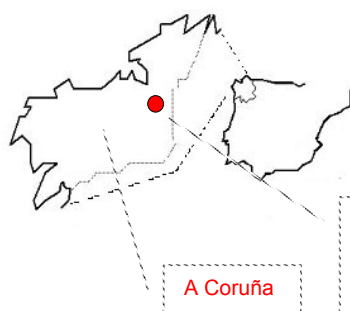
Tabla 3.8. Productos de tioacidolisis del xilema de *Phyllitis scolopendrium*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	25,0	296(1), 281(8), 235 (12), 204(9), 131(49), 75(81), 73(100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	28,3	297(18), 235(43), 209(17), 205(17), 75(100), 73(58)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	31,6	239(100), 205(8), 75(6), 73(21)	Alcohol <i>p</i> -cumarílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	32,6	327(1), 295(5), 269(100), 239(4), 209(23), 192(3), 135(33), 73(10)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	32,9	295(3), 269(100), 235(7), 75(5), 73(17)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β -O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	33,1	283(27), 222(100), 192(37), 135(76), 75(8)	Coniferilaldehído unido por enlaces β -O-4
	35,4	269(100), 73(31)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

Dryopteris affinis

Dryopteriaceae

PTERIDOPHYTA



Chelo (Coirós)

I: 43° 15,871' N

L: 008° 9,765' W

Altitud: 26 m

A Coruña



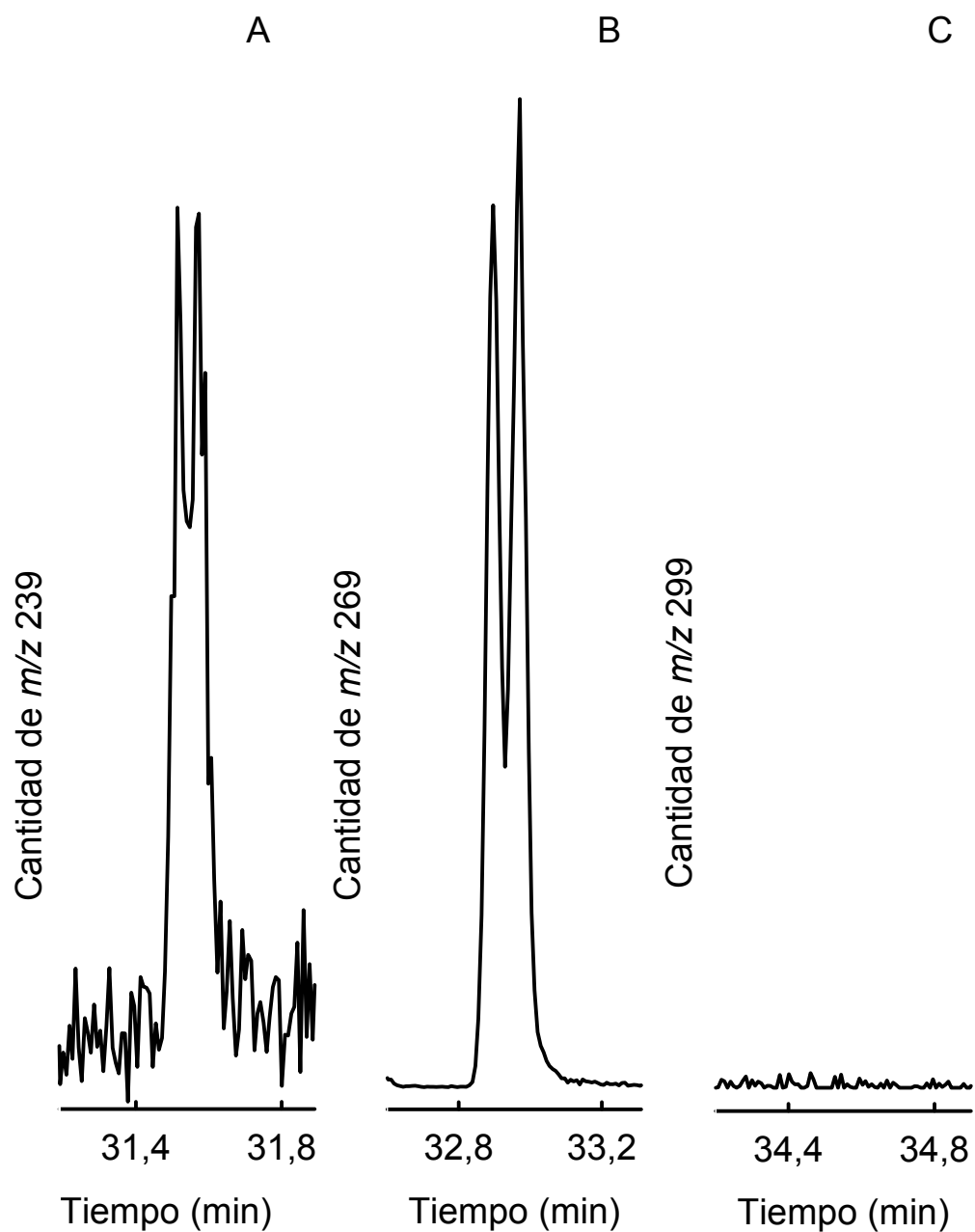


Figura 3.29. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Dryopteris affinis*.

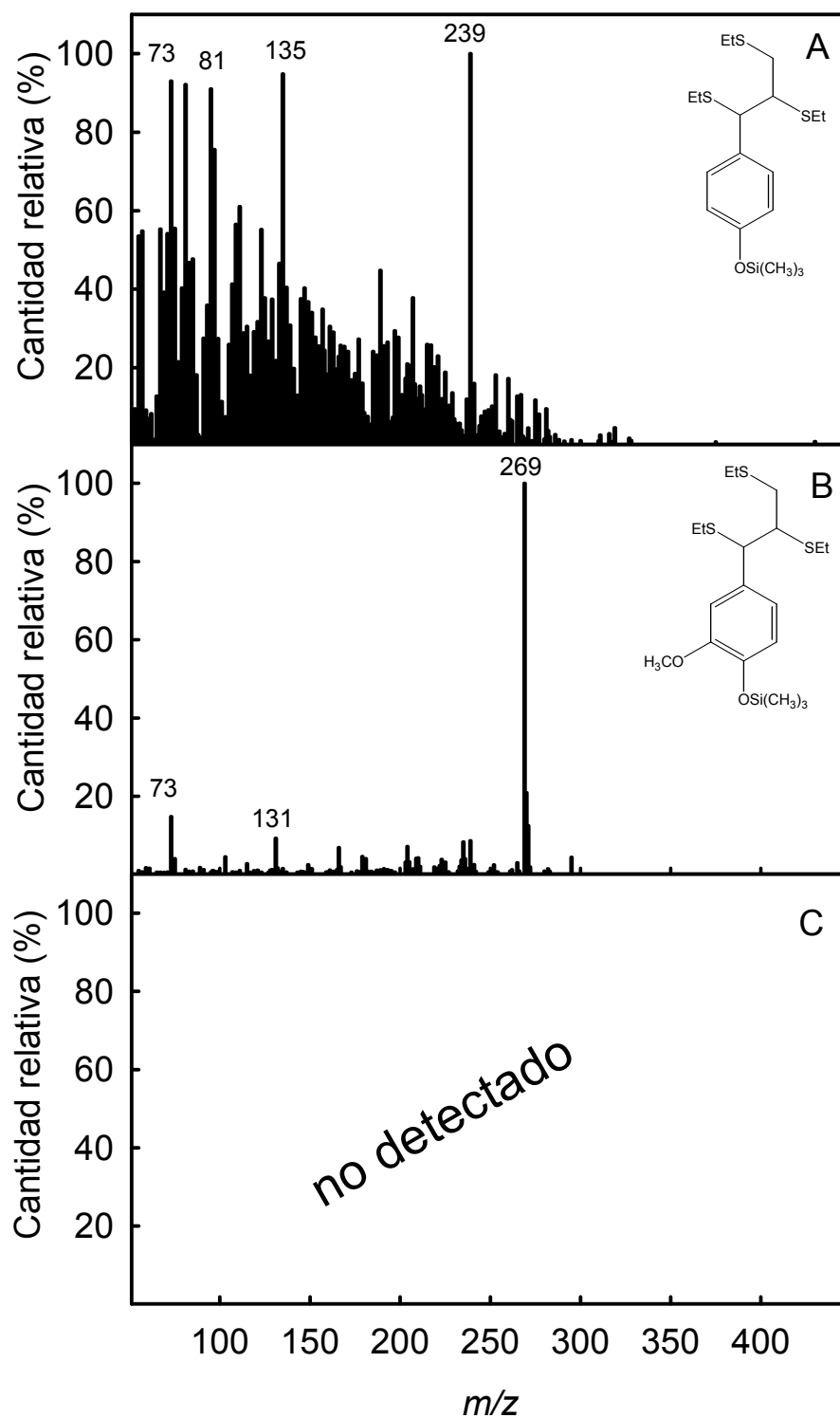
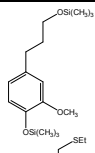
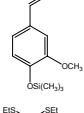

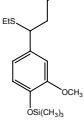
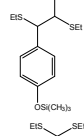
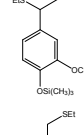
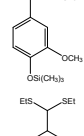
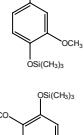
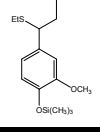


Figura 3.30. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Dryopteris affinis*.

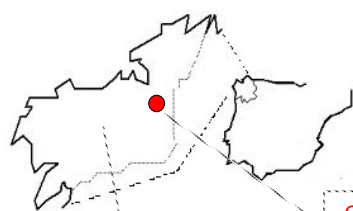
Tabla 3.9. Productos de tioacidólisis del xilema de *Dryopteris affinis*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidólisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	20,0	326(2), 311(1), 236(44), 221(34), 209(5), 206(100), 179(37), 73(59)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	25,0	296(3), 281(2), 235 (57), 204(31), 131(93), 75(48), 73(100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	26,6	269(100), 239(5)	Vanillina O-4-terminal
	28,3	358(4), 343(), 297(40), 235(100), 209(19), 205(31), 75(91), 73(70)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	31,6	265(13), 239(100), 205(20), 75(55), 73(93)	Alcohol <i>p</i> -cumarílico unido por enlaces β-O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	32,6	418(), 356(3), 327(3), 295(15), 269(100), 239(14), 209(7), 192(13), 135(45), 73(41)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	33,0	295(4), 269(100), 235(8), 75(4), 73(15)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	33,1	418(1), 403(), 283(22), 222(100), 192(20), 135(53), 75(11), 73(33)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	35,3	269(100), 73(24)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

Pteridium aquilinum

Pteridiaceae

PTERIDOPHYTA



A Coruña

Chelo (Coirós)

I: 43° 15,871' N

L: 008° 9,765' W

Altitud: 26 m

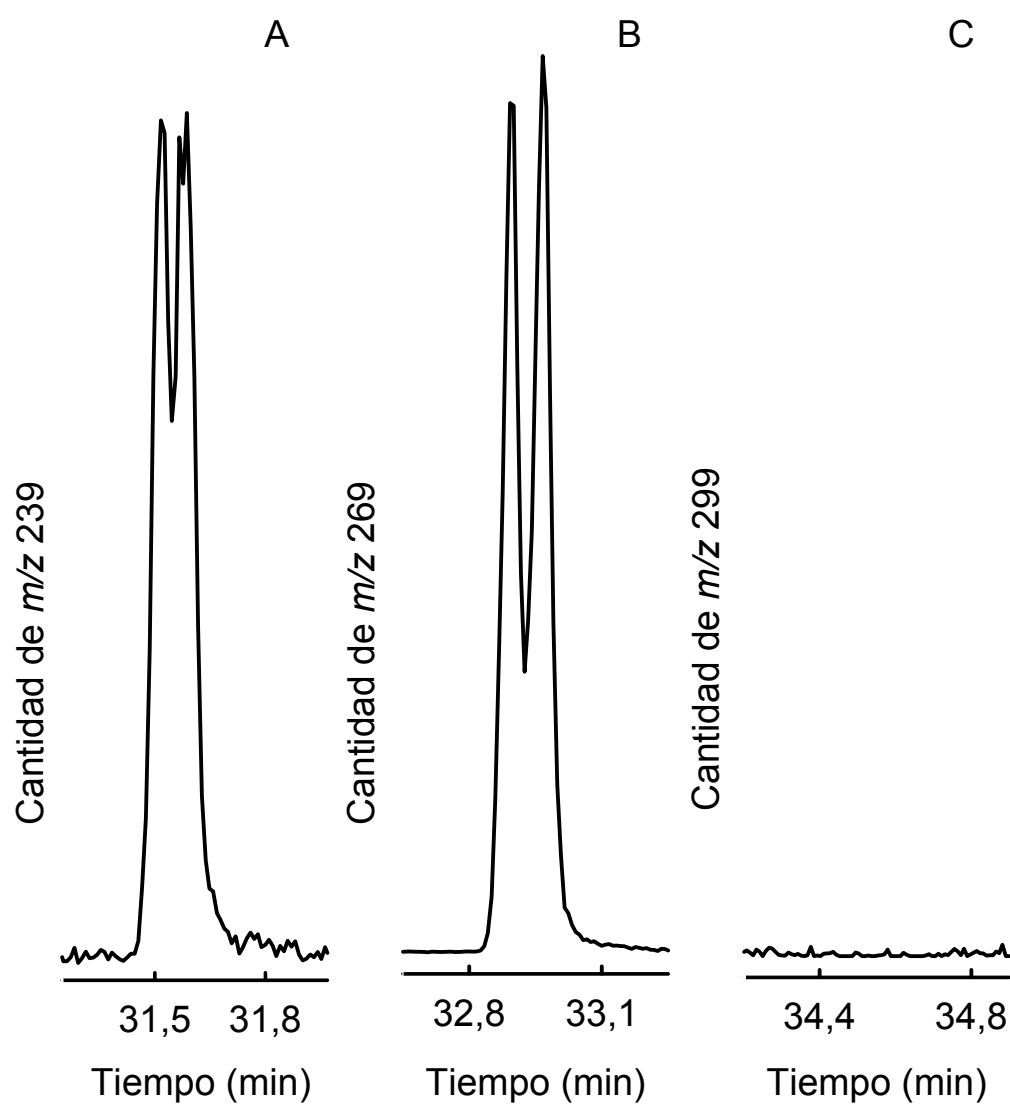


Figura 3.31. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Pteridium aquilinum*.

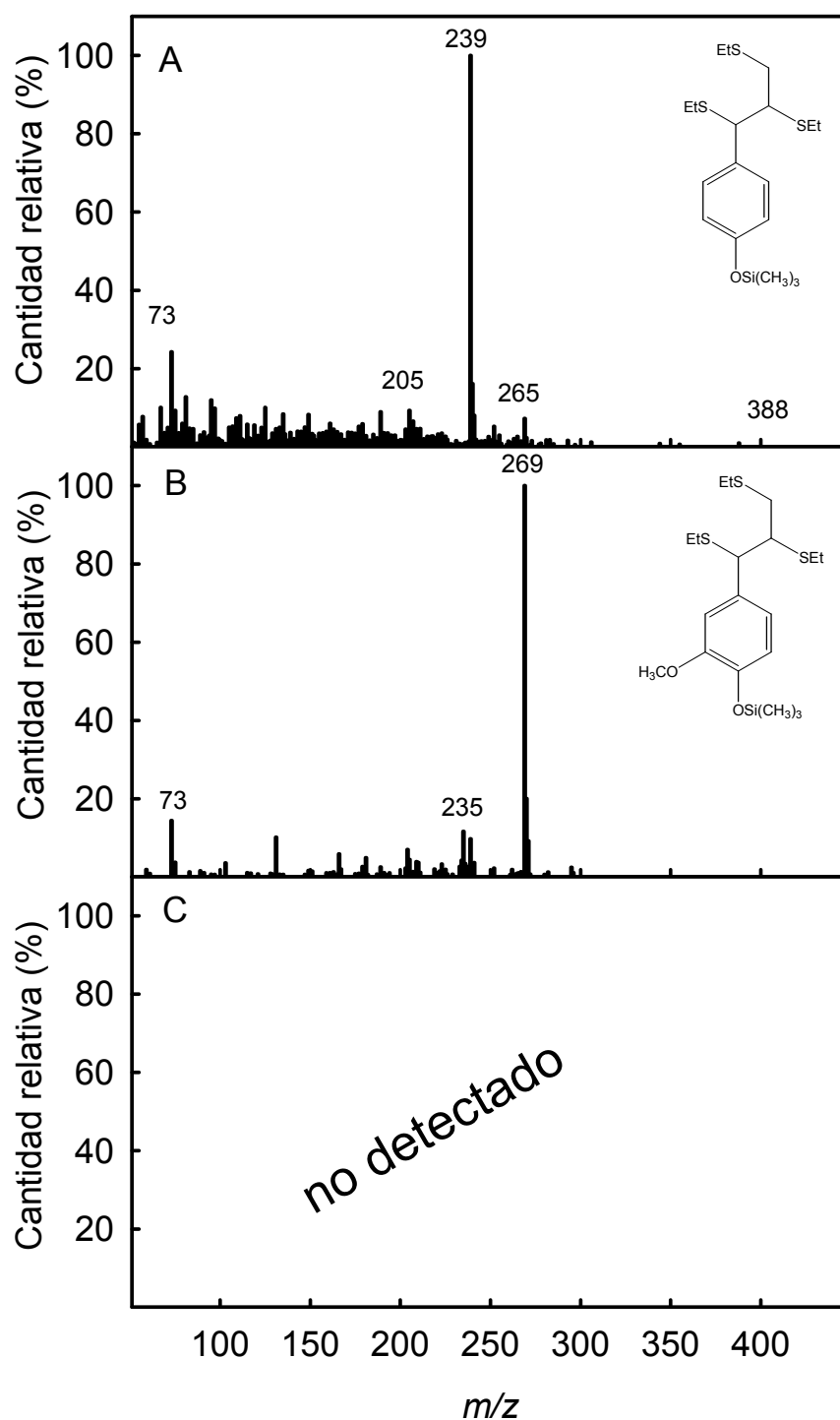
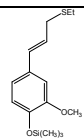
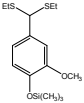
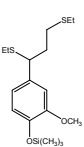
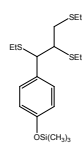
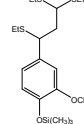
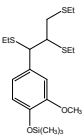
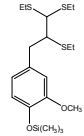
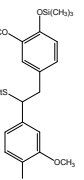


Figura 3.32. Espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Pteridium aquilinum*.

Tabla 3.10. Productos de tioacidólisis del xilema de *Pteridium aquilinum*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidólisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	25,0	296(4), 281(2), 235 (72), 204(34), 131(100), 75(8), 73(28)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	26,6	269(100), 239(30), 73(88)	Vanillina O-4-terminal
	28,3	358(1), 297(53), 235(100), 209(21), 205(31), 75(94), 73(57)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	31,6	388(1), 265(5), 239(100), 205(10), 75(10), 73(26)	Alcohol <i>p</i> -cumarílico unido por enlaces β-O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	32,6	327(3), 295(6), 269(100), 239(15), 209(11), 192(5), 135(48), 73(39)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	33,0	295(3), 269(100), 235(12), 75(4), 73(14)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	33,1	418(), 403(), 283(27), 222(100), 192(18), 135(67), 75(20), 73(35)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	35,3	269(100), 73(32)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

Ceratopteris thalictroides es un filicófito acuático en cuyas paredes degradadas por tioacidólisis apareció como producto derivado de la rotura de los enlaces β-O-4 de las ligninas los silil derivados del alcohol coniferílico (Figuras 3.22 y 3.23) y las unidades estilbeno derivadas del mismo (Tabla 3.6).

La degradación por nitrobenzeno de sus paredes celulares reveló la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído y vanillina (Figura 3.24).

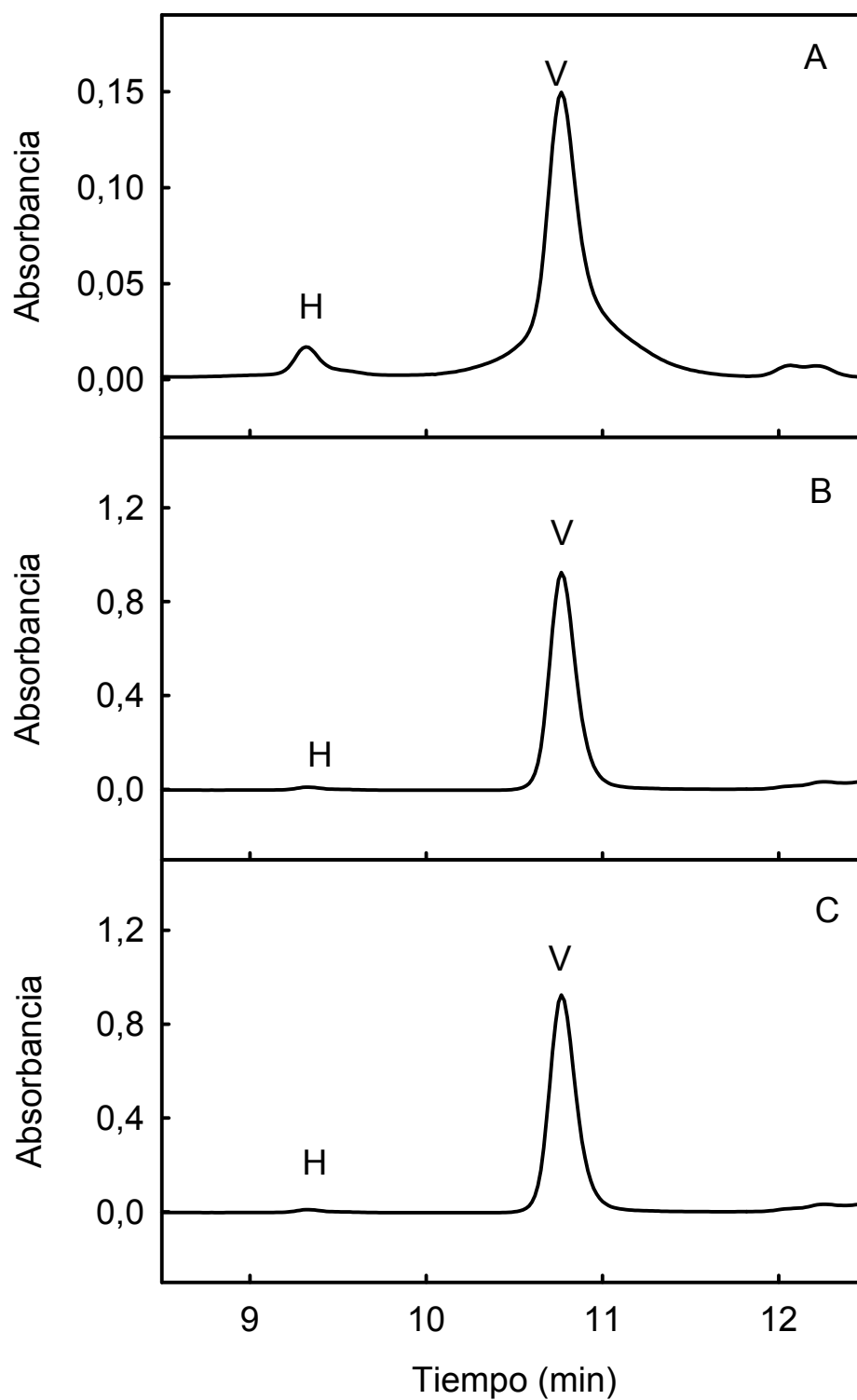


Figura 3.33. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzeno obtenidos de las paredes celulares de *Phyllitis scolopendrium* (A), *Dryopteris affinis* (B) y *Pteridium aquilinum* (C), mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H) y vanillina (V).

Aunque *Ceratopteris coruna* es del mismo género que *Ceratopteris thalictroides*, los productos que se obtienen de la degradación de sus paredes por tioacidolisis son diferentes. *Ceratopteris cornuta* contiene los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figuras 3.25 y 3.36), con similares proporciones de los dos últimos y apareciendo cantidades traza del primero (Tabla 3.12). Además, fueron encontrados restos derivados del coniferilaldehído que al igual que los anteriores proceden de la rotura de enlaces β -O-4 y unidades estilbeno procedentes del alcohol coniferílico (Tabla 3.7).

La degradación con nitrobenzono (Figura 3.24) reveló la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído en total concordancia con los resultados obtenidos por tioacidolisis y en proporciones equiparables (Tabla 3.13).

Los resultados de la tioacidolisis del filicófito *Phyllitis scolopendrium* revelaron la presencia en sus paredes de los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico (Figuras 3.27 y 3.28), aunque el primero en cantidades no cuantificables (Tabla 3.12), y del aldehído coniferílico, procedentes todos ellos de la degradación de enlaces β -O-4 (Tabla 3.8).

También se detectaron restos derivados del alcohol y del aldehído coniferílicos, procedentes de la rotura de enlaces O-4-terminales así como unidades estilbeno (Tabla 3.12).

Los resultados de la oxidación con nitrobenzono (Tabla 3.13) confirmaron totalmente los obtenidos por tioacidolisis ya que fueron detectados *p*-hidroxibenzaldehído y vanillina (Figura 3.33).

Dryopteris affinis también es un filicófito y la tioacidolisis de sus paredes celulares reveló que sus ligninas contienen cantidades muy importantes (Tabla 3.12) de los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico (Figuras 3.29 y 3.30) así como coniferilaldehído procedente, como los anteriores de la rotura de enlaces β -O-4. También se encontraron productos de la rotura de enlaces O-4-terminales que revelan la presencia de alcohol y aldehído coniferílico, alcohol dihidroconiferílico y vanillina, y también estructuras estilbeno (Tabla 3.19).

La oxidación con nitrobenzono de sus paredes confirmó también los resultados de tioacidolisis al ser encontrado *p*-hidroxibenzaldehído y vanillina (Tabla 3.13 y Figura 3.33).

Pteridium aquilinum, filicófito, tiene ligninas similares a las de *Dryopteris affinis*, en la tioacidolisis de sus paredes fueron encontrados productos (Tabla 3.10) que ponen de manifiesto la presencia en sus ligninas de los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico (Figuras 3.31 y 3.32) así como el coniferilaldehído procedentes de la rotura de enlaces β -O-4 (Tabla 3.10) en cantidades importantes (Tabla 3.12) y también residuos procedentes de la rotura de enlaces O-4-terminales que evidencian la presencia de los alcoholes coniferílico y dihidroconiferílico, vanillina y coniferilaldehído, así como unidades estilbeno (Tabla 3.10).

La degradación de las paredes de *Pteridium aquilinum* con nitrobenzono evidencia la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído y vanillina (Tabla 3.13 y Figura 3.33) en total concordancia con los resultados de tioacidolisis.

Angiospermas

Posidonia oceanica

Posidoniaceae

MAGNOLIOPHYTA

Alicante

Dehesa de Campoamor
 I: 37° 51,861' N
 L: 000° 45,341' W
 Altitud: 0 m

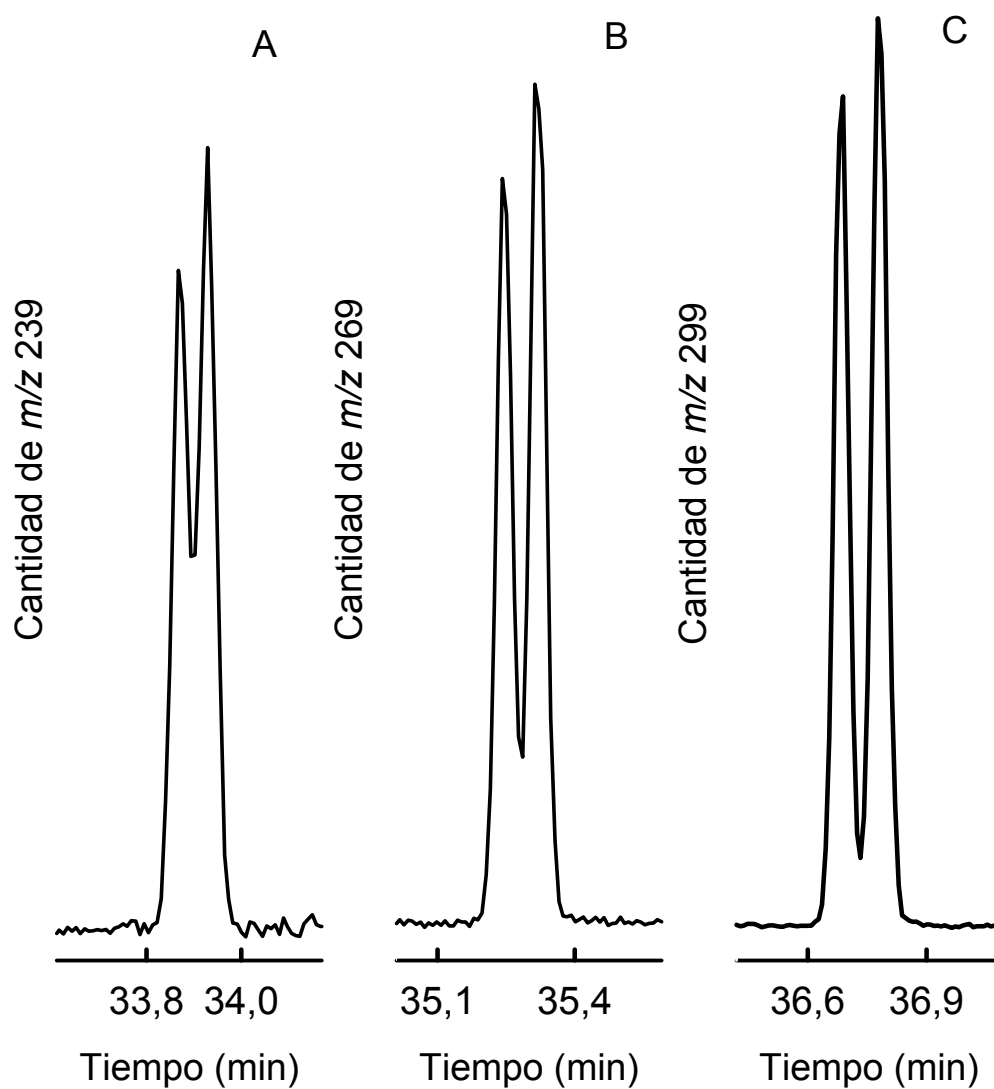


Figura 3.34. Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(A), coniferílico (B) y sinapílico (C), en las ligninas del xilema de *Posidonia oceanica*.

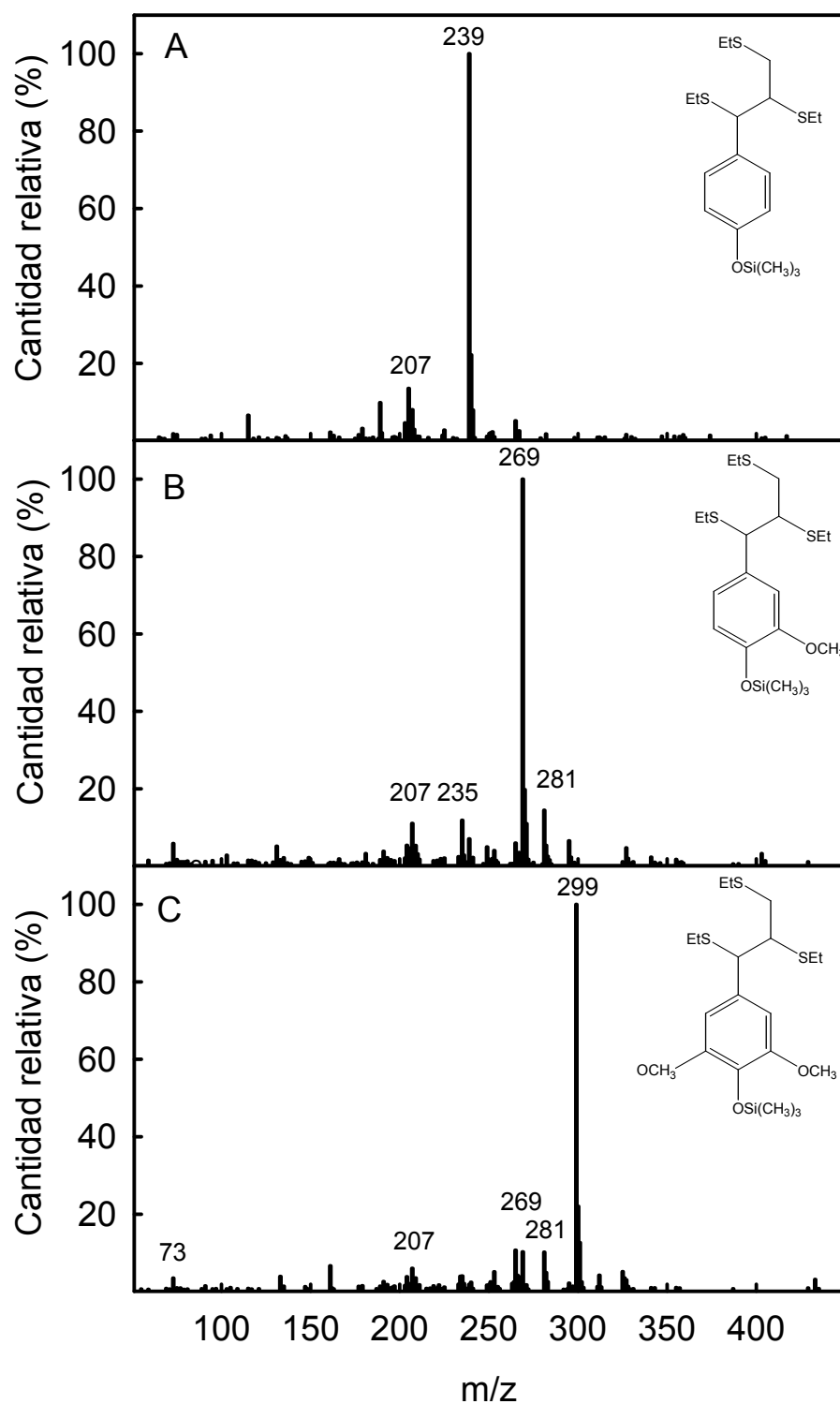
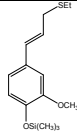
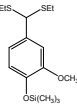
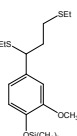
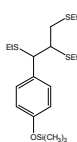
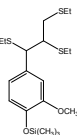
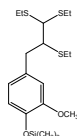
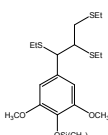
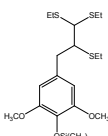
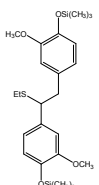


Figura 3.35. Espectros de masas de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a), coniferílico (b) y sinapílico (c), en las ligninas del xilema de *Posidonia oceanica*.

Tabla 3.11. Productos de tioacidolisis del xilema de *Posidonia oceanica*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	27,3	296(33), 235 (100), 204(3), 131(77)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	27,4	330(2), 315(2), 269(100), 239(9), 73(66)	Vanillina O-4-terminal
	30,1	358(10), 343(14), 297(54), 235(38), 209(40), 205(30), 75(58), 73(100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	33,9	265(5), 239(100), 205(14), 75(2), 73(2)	Alcohol <i>p</i> -cumarílico unido por enlaces β-O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	35,2	418(), 403(3), 295(7), 269(100), 235(12), 75(2), 73(6)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	35,4	418(4), 403(5), 283(47), 222(16), 192(22), 135(38), 75(14), 73(100)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	36,8	325(5), 299(100), 269(10), 265(11), 239(2), 75(1), 73(3)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β-O-4 (<i>eritro</i> y <i>treo</i>)
	36,9	433(3), 313(81), 252(100), 222(30), 135(14), 75(5)	Sinapilaldehído unido por enlaces β-O-4
	37,9	478(3), 463(3), 417(16), 269(95), 73(100)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

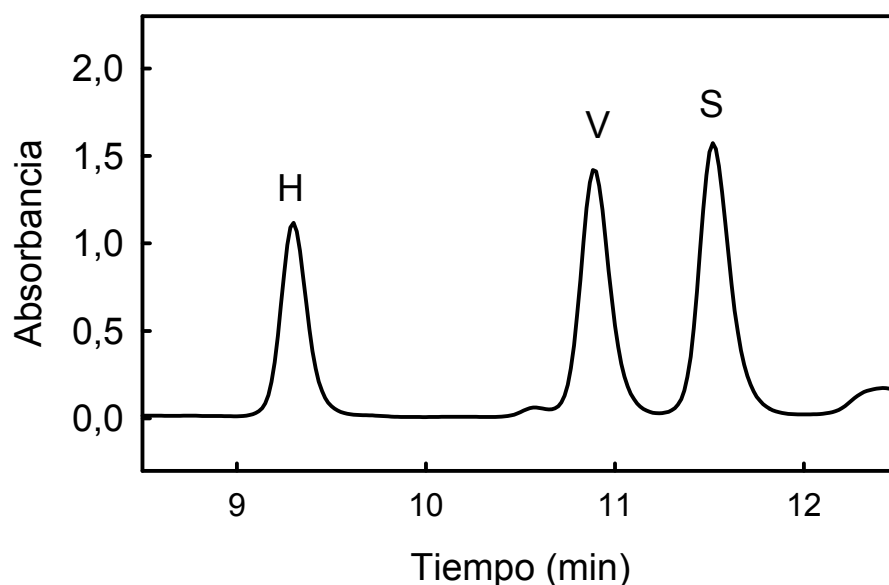


Figura 3.36. Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzono obtenidos de las paredes celulares de *Posidonia oceanica*, mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanillina (V) y siringaldehído (S).

La tioacidolisis de las paredes celulares de la angiosperma marina *Posidonia oceánica* puso de manifiesto la presencia en sus ligninas de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figuras 3.34 y 3.35), de los aldehídos coniferílico y sinapílico, procedentes todos ellos de la rotura de enlaces β -O-4, así como alcohol y aldehído coniferílicos y vanillina procedentes de la rotura de los enlaces O-4-terminales y unidades estilbeno (Tablas 3.11 y 3.12).

La presencia de *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído entre los productos de la degradación por nitrobenzono (Figura 3.36), en proporciones muy similares, confirman los resultados de tioacidolisis (Tabla 3.13).

II.2.1. Comparación entre especies

Los resultados de la tioacidolisis de las paredes celulares revelaron la presencia inequívoca de ligninas para todas las especies estudiadas a excepción de las algas y del musgo *Physcomitrella patens*. Asimismo pusieron en evidencia que los productos más abundantes de la degradación de las paredes celulares de las especies vegetales estudiadas (Tabla 3.12) fueron los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) (Figuras 3.7, 3.9, 3.10, 3.12, 3.14, 3.15, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.22, 3.23, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.30, 3.31, 3.32, 3.38 y 3.35) que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de las unidades G, típicas de las ligninas de gimnospermas, aunque los valores medidos para las mismas fueron muy diferentes, entre los diferentes grupos y entre especies del mismo grupo. La presencia de

unidades S es irregular y no sigue un patrón claro. Aparecen en *Marchantia polymorpha* (hepática) en cantidades traza, *Isoetes hystrix* y *Selaginella martensii* (licopodios), *Ceratopteris cornuta* (filicófito) y *Posidonia oceanica* (angiosperma acuática) mientras que no lo hacen en *Isoetes fluitans* (licopodio), *Equisetum telmateia* (esfenófito) y *Ceratopteris thalictroides*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis* y *Pteridium aquilinum* (filicófitos). Las unidades H aparecen también de forma irregular, están presentes en *Posidonia oceanica*, en todos los filicófitos a excepción de *Ceratopteris thalictroides*, en *Selaginella martensii* y en *Marchantia polymorpha* y no están presentes en el resto de las especies.

También mostraron que los monómeros unidos por enlaces aril-glicerol- β -aril éter derivados del coniferilaldehído están presentes solo en la angiosperma *P. oceanica*, en los helechos más evolucionados - *Ceratopteris cornuta*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis* y *Pteridium aquilinum* - pertenecientes al grupo de los filicófitos, en el licófito *Selaginella martensii* y en la hepática *Marchantia polymorpha* (Tabla 3.12). Los monómeros unidos por enlaces β -O-4 derivados del sinapilaldehído están presentes en la única angiosperma estudiada *Posidonia oceanica* y en el licófito *Selaginella martensii* (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Productos de degradación obtenidos por tioacidólisis de las paredes celulares de las especies vegetales estudiadas. Los valores se dan en corriente iónica total (TIC) $\times 10^{-8} \text{ mg}^{-1}$ pared celular. Est: estructuras estilbeno; CAIc: alcohol coniferílico; CAId: coniferilaldehído; SAlc: alcohol sinapílico; SAId: sinapilaldehído; CmAlc: alcohol *p*-cumarílico; DHCA: alcohol dihidroconiferílico; V: vanillina; Tr: cantidades traza. La desviación estándar de los valores se encuentra dentro del 5% del valor de la media.

Especie	β -O-4					Est	O-4-end			
	CAIc	CAId	SAlc	SAId	CmAlc		CAIc	CAId	DHCA	V
1 <i>M. stellatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 <i>U. rigida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 <i>C. baccata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 <i>M. polymorpha</i>	10,94	Tr	Tr	-	1,88	-	-	-	Tr	-
5 <i>P. patens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 <i>I. fluitans</i>	49,76	-	-	-	-	-	-	0,49	-	-
7 <i>I. hystrix</i>	13,90	-	5,15	-	-	Tr	-	-	-	Tr
8 <i>E. telmateia</i>	8,08	-	-	-	-	-	Tr	Tr	-	-
9 <i>C. thalictroides</i>	12,90	-	-	-	-	Tr	-	-	-	-
10 <i>C. cornuta</i>	25,61	Tr	23,96	-	Tr	Tr	-	-	-	-
11 <i>P. scolopendrium</i>	36,22	Tr	-	-	Tr	Tr	1,48	Tr	-	-
12 <i>D. affinis</i>	153,53	7,45	-	-	5,43	9,17	8,55	1,69	2,69	3,99
13 <i>P. aquilinum</i>	192,50	5,53	-	-	6,01	4,71	12,88	4,46	-	4,80
14 <i>P. oceanica</i>	14,79	4,70	30,51	Tr	3,84	Tr	Tr	-	-	Tr

En ninguna de las muestras ensayadas se encontró ácido ferúlico o ácido *p*-cumárico cuyos ésteres polisacáridicos se han descrito como centros de nucleación de la lignificación (Ralph y cols. 1995).

Los análisis de tioacidolisis no revelaron cantidades importantes de unidades O-4-terminales (Tabla 3.12), solo los filicófitos *Dryopteris affinis* y *Pteridium aquilinum* y el licófito *Selaginella martensii* presentan cantidades significativas de estas unidades, principalmente aquellas derivadas del alcohol coniferílico, siendo menores las cantidades de coniferilaldehído y de vanillina. Junto a ellas, en *Dryopteris affinis* y en *Selaginella martensii* se observó la presencia de la unidad O-4-terminal derivada del alcohol dihidroconiferílico (DHCA) (Tabla 3.12), un monómero típico de las ligninas de las gimnospermas (Lapierre y cols. 1995, Gómez-Ros y cols. 2007b).

Con la excepción de la vanillina, que puede surgir del coniferilaldehído mediante una reacción de tipo aldol en la pared celular (Kim y cols. 2002), el resto de las unidades O-4-terminales presentes en esta fracción de las ligninas merecen una atención especial. La mayoría de estas estructuras son centros de nucleación (iniciación) del crecimiento de las ligninas, ya que éstas sólo pueden surgir del acoplamiento de un radical β de un monolignol con el radical O-4 de una unidad terminal (Durbeej y Eriksson 2003). En otras palabras, estas unidades O-4-terminales actúan como centros de nucleación a los cuales los radicales β de los monolignoles se añaden en pasos sucesivos, permitiendo así a la red de ligninas crecer por adiciones sucesivas de los radicales β (Durbeej y Eriksson 2003). Sin embargo, el crecimiento lineal del polímero de lignina no es infinito ya que los sitios para la adición de los radicales β de los monolignoles pueden llegar a saturarse (Gabaldón y cols. 2006).

Los resultados de la oxidación con nitrobenzeno aparecen reflejados en la tabla 3.13 y, cualitativamente, no son muy diferentes de los obtenidos por tioacidolisis (Tabla 3.15) siempre que se tenga en consideración lo anteriormente indicado sobre la tendencia a la sobreestimación de las cantidades de *p*-hidroxibenzaldehído procedentes de la liberación de productos similares al alcohol *p*-cumarílico.

Teniendo esto en cuenta se pueden formular las observaciones y comparaciones que a continuación se indican.

En las tres algas estudiadas *Mastocarpus stellatus*, *Cystoseira baccata* y *Ulva rigida* aparecen solo pequeñas cantidades de *p*-hidroxibenzaldehído, lo que en principio podría ser interpretado como indicativo de la presencia de unidades H procedentes de ligninas, pero que a la vista de los resultados de tioacidolisis parece más apropiado atribuirlos a la liberación de compuestos fenólicos con un esqueleto aromático similar a los grupos H.

Una situación parecida se puede describir para el musgo *Physcomitrella patens*, con nulos resultados también en la tioacidolisis y mínimas cantidades de *p*-hidroxibenzaldehído en la oxidación con nitrobenzeno.

De la hepática *Marchantia polymorpha* se obtuvieron, por oxidación con nitrobenzeno, los tres compuestos buscados, *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído, en total coincidencia con los resultados de tioacidolisis, lo que implica

que esta planta basal terrestre, considerada de las primeras colonizadoras de la tierra, contiene ligninas y en ellas hay unidades H, G y S.

Los resultados obtenidos con los licopodios *Isoetes fluitans* e *Isoetes histrix* fueron contradictorios, la oxidación con nitrobenceno produjo vanillina, en proporciones muy parecidas a las obtenidas para el alcohol coniferílico en la tioacidolisis. Esto confirmaría la presencia de unidades G en las ligninas de ambas especies. Pero, mientras en la oxidación con nitrobenceno no se obtuvieron resultados positivos para el siringaldehído, la tioacidolisis sí los ofreció para el alcohol sinapílico (en el caso de *Isoetes histrix*), con lo que se podría dudar de la presencia de unidades S, si no fuese porque la tioacidolisis es considerada una prueba con resultados concluyentes. También se podría dudar de la presencia de unidades H, dados los resultados de tioacidolisis y a pesar de ser positivos en la oxidación con nitrobenceno.

Equisetum telmateia ofreció resultados claros para los grupos G, presentes en ambas degradaciones. En la oxidación con nitrobenceno también se liberaron unidades H que no aparecieron en la tioacidolisis.

Tabla 3.13. Productos de oxidación alcalina con nitrobenceno obtenidos de las paredes celulares de las especies vegetales estudiadas.

Especie	(µg mg ⁻¹ pared celular)				H/G/S ratio
	p-HBA (H)	Vanillina (G)	Siringaldehído (S)	H + G + S	
1 <i>M. stellatus</i>	0,15 ± 0,04	-	-	0,15 ± 0,04	100/0/0
2 <i>C. baccata</i>	0,06 ± 0,01	-	-	0,06 ± 0,01	100/0/0
3 <i>U. rigida</i>	0,09 ± 0,09	-	-	0,09 ± 0,09	100/0/0
4 <i>M. polymorpha</i>	1,72 ± 0,04	3,85 ± 0,09	0,31 ± 0,05	5,88 ± 0,18	29/66/5
5 <i>P. patens</i>	0,07 ± 0,01	-	-	0,07 ± 0,01	100/0/0
6 <i>I. fluitans</i>	0,66 ± 0,03	5,16 ± 0,23	-	5,82 ± 0,25	11/89/0
7 <i>I. histrix</i>	0,17 ± 0,02	1,82 ± 0,52	-	1,99 ± 0,49	8/92/0
8 <i>E. telmateia</i>	0,16 ± 0,02	0,41 ± 0,04	-	0,57 ± 0,06	28/72/0
9 <i>C. thalictroides</i>	0,26 ± 0,01	1,25 ± 0,08	-	1,51 ± 0,09	17/83/0
10 <i>C. cornuta</i>	0,21 ± 0,06	1,85 ± 0,09	1,26 ± 0,19	3,32 ± 0,22	6/56/38
11 <i>P. scolopendrium</i>	0,21 ± 0,05	1,19 ± 0,01	-	1,40 ± 0,06	15/85/0
12 <i>D. affinis</i>	0,20 ± 0,06	10,62 ± 0,28	-	10,82 ± 0,35	2/98/0
13 <i>P. aquilinum</i>	0,18 ± 0,16	22,32 ± 0,90	-	22,50 ± 1,05	1/99/0
14 <i>P. oceanica</i>	0,30 ± 0,14	1,36 ± 0,48	2,07 ± 1,06	3,72 ± 1,68	8/36/56

p-HBA = p-hidroxibenzaldehído

Los resultados obtenidos con los filicófitos, los helechos más evolucionados, *Ceratopteris thalictroides*, *Ceratopteris cornuta*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis* y *Pteridium aquilinum* fueron similares, cualitativamente, en ambas degradaciones para los cuatro últimos, los únicos productos de degradación encontrados fueron los que corresponden a las unidades G y H. No aparecieron unidades S. Los dos últimos fueron los que presentaron valores absolutos más altos para las unidades G, tanto en la oxidación con nitrobenceno como en la tioacidolisis.

De todos ellos, solo *Ceratopteris cornuta* presentó unidades S, en cantidades cuantitativamente importantes, y en ambos procesos de degradación.

Ceratopteris thalictroides, solo liberó unidades G en la tioacidolisis mientras que en la oxidación con nitrobenzeno dio resultados positivos para los grupos *p*-hidroxifenilo (H) en cantidades comparativamente importantes.

La única angiosperma sometida a estudio, *Posidonia oceanica*, ofreció resultados idénticos por tioacidolisis y por oxidación con nitrobenzeno. En ambos casos aparecieron claramente unidades H, G y S, con resultados bastante parecidos.

Es de destacar la casi total coincidencia de los resultados obtenidos en la tioacidolisis y en la degradación con nitrobenzeno. Se encontraron unidades guaiacilo (G), con ambas reacciones, en las mismas especies, *Marchantia polymorpha*, *Isoetes fluitans*, *Isoetes hixtrix*, *Equisetum telmateia*, *Ceratopteris thalictroides*, *Ceratopteris cornuta*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis*, *Pteridium aquilinum* y *Posidonia oceanica*.

La única diferencia encontrada para las unidades siringilo (S) se produce en *Isoetes hixtrix*, que dió resultados positivos en tioacidolisis y no en nitrobenzeno. En el resto de especies hay total coincidencia, *Marchantia polymorpha*, *Ceratopteris cornuta* y *Posidonia oceanica*.

También hay coincidencia en la presencia de unidades *p*-hidroxifenilo (H). Los resultados de tioacidolisis fueron positivos para *Marchantia polymorpha*, *Ceratopteris cornuta*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis*, *Pteridium aquilinum* y *Posidonia oceanica*. Los resultados de nitrobenzeno fueron positivos para todas las especies lo que, de alguna forma, confirmaría la posible sobreestimación que la oxidación con nitrobenzeno obtiene para este residuo.

II.3. Caracterización de ligninas mediante tioacidolisis y oxidación con nitrobenzeno: Relaciones H/G/S

La tioacidolisis es una técnica degradativa que rompe las ligninas por los enlaces β -O-4, que constituyen las uniones predominantes en éstas (Lapierre y cols. 1995), y cuya contribución puede variar entre un 50% en gimnospermas y el 80% en angiospermas (Ralph y cols. 2004). Por este motivo, la tioacidolisis solubiliza sólo la fracción de lignina no condensada (Anterola y Lewis 2002), localizada principalmente en las paredes celulares secundarias (Ruel y cols. 2002).

Un análisis de la presencia de unidades G, S y H es fundamental para establecer el tipo de ligninas presentes en cada especie. Las ligninas en las que predominan las unidades G son consideradas típicas de gimnospermas, mientras que aquellas en las que predominan las unidades S son propias de angiospermas. Se parte de la idea, no avalada por estudios recientes, de que las ligninas de las plantas basales son similares a las de las gimnospermas.

Un alto contenido en unidades H es típico de las ligninas de la pared celular primaria (Fukushima y Terashima 1991). Por el contrario, las ligninas de la pared celular secundaria están compuestas mayoritariamente de unidades G y S, con

predominancia de las uniones de tipo β -O-4, dando lugar a un polímero lineal (Terashima y Fukushima 1988, Chabannes y cols. 2001, Gómez-Ros y cols. 2007b). Sin embargo, en los tejidos vasculares, la mayor parte de la pared celular es de tipo secundario.

Los resultados de la degradación por tioacidólisis (Tabla 3.12) y por oxidación con nitrobenzeno (Tabla 3.13) nos permiten afirmar que las algas estudiadas (*Mastocarpus stellatus*, *Cystoseira baccata* y *Ulva rigida*) y el musgo *Physcomitrella patens* no contienen ligninas. El resto de las plantas sometidas a estudio sí las contienen. En las ligninas de las plantas basales se da un claro predominio de las unidades G.

Salvo en *Selaginella martensii* y en *Ceratopteris cornuta* la suma de unidades G y H representan más del 70% del total. En la mayoría de los casos esta suma supera el 90% del total. Esto nos permite afirmar que las ligninas de estas especies son las típicas de gimnospermas ya que, las ligninas de gimnospermas están compuestas típicamente de unidades G con una menor proporción de unidades H, mientras que en angiospermas las ligninas están formadas por niveles similares de unidades G y S (Gross 1980, Donaldson 2001).

Tabla 3.14. Composición monomérica de las ligninas obtenida mediante tioacidólisis de las paredes celulares de las especies estudiadas.

	Especie	Relación H/G/S (%)
1	<i>Mastocarpus stellatus</i>	0/0/0
2	<i>Ulva rigida</i>	0/0/0
3	<i>Cystoseira baccata</i>	0/0/0
4	<i>Marchantia polymorpha</i>	14/80/6
5	<i>Physcomitrella patens</i>	0/0/0
6	<i>Isoetes fluitans</i>	0/100/0
7	<i>Isoetes histrix</i>	0/73/27
8	<i>Selaginella martensii</i>	3/27/70 ¹
9	<i>Equisetum telmateia</i>	0/100/0
10	<i>Ceratopteris thalictroides</i>	0/100/0
11	<i>Ceratopteris cornuta</i>	0/52/48
12	<i>Phyllitis scolopendrium</i>	0/100/0
13	<i>Dryopteris affinis</i>	3/97/0
14	<i>Pteridium aquilinum</i>	3/97/0
15	<i>Posidonia oceanica</i>	8/30/62

¹ Datos de Gomez Ros (2007a)

Solo *Selaginella martensii* (un licopodio) y *Ceratopteris cornuta* (un filicófito acuático) tienen ligninas de tipo S, propias de angiospermas. *Isoetes histrix* (un licopodio próximo a *Selaginella martensii*) tiene ligninas que incluyen grupos siringilo (S), pero en menor proporción que la suma de G y H.

La única angiosperma sometida a estudio, la monocotiledónea marina *Posidonia oceanica*, dispone claramente de ligninas de tipo S, propias de angiospermas, ya que la suma de las unidades G y de las unidades S representan más del 90% del total.

La comparación de los resultados obtenidos por tioacidólisis y por oxidación con nitrobenceno de la distribución de grupos H, G y S en las ligninas (Tabla 3.15) ofrece resultados totalmente comparables siempre que se tenga en cuenta la, ya citada, sobreestimación de abundancia de grupos H que se produce al emplear el segundo de los métodos. Aún así, parecen métodos complementarios muy útiles para el estudio de la naturaleza de las ligninas. En general, se admite que la tioacidólisis es un método de gran sensibilidad que permite buenos resultados con muy poca cantidad de muestra, aunque su acción degradativa se vea limitada a los enlaces β -O-4 (Lapierre y cols. 1995).

Tabla 3.15. Composición monomérica de las ligninas obtenida mediante oxidación con nitrobenceno (NBO) y tioacidólisis (TA) de las paredes celulares de las especies estudiadas. Tr: traza.

Especie	H (%)		G (%)		S (%)	
	NBO	TA	NBO	TA	NBO	TA
1 <i>Mastocarpus stellatus</i>	100	0	0	0	0	0
2 <i>Cystoseira baccata</i>	100	0	0	0	0	0
3 <i>Ulva rigida</i>	100	0	0	0	0	0
4 <i>Marchantia polymorpha</i>	29	14	66	80	5	6
5 <i>Physcomitrella patens</i>	100	0	0	0	0	0
6 <i>Isoetes fluitans</i>	11	0	89	100	0	0
7 <i>Isoetes histrix</i>	8	0	92	73	0	27
8 <i>Selaginella martensii</i>	22 ¹	3 ²	34 ¹	27 ²	44 ¹	70 ²
9 <i>Equisetum telmateia</i>	28	0	72	100	0	0
10 <i>Ceratopteris thalictroides</i>	17	0	83	100	0	0
11 <i>Ceratopteris cornuta</i>	6	Tr	56	52	38	48
12 <i>Phyllitis scolopendrium</i>	15	Tr	85	100	0	0
13 <i>Dryopteris affinis</i>	2	3	98	97	0	0
14 <i>Pteridium aquilinum</i>	1	3	99	97	0	0
15 <i>Posidonia oceanica</i>	8	8	36	30	56	62

¹ Datos de Gros, 1980

² Datos de Gomez Ros, 2007a

II.4. Caracterización de las ligninas: aproximación al grado de polimerización

La tioacidólisis acoplada al análisis por GC-MS de la lignificación de las paredes celulares de las especies vegetales estudiadas reveló la ausencia total de ligninas en las algas (*Mastocarpus stellatus*, *Cystoseira baccata* y *Ulva rigida*) y el musgo (*Physcomitrella patens*) y cierta uniformidad en la composición monomérica de los

enlaces β -O-4 de las especies en las que los resultados fueron positivos. Por ejemplo, demostró la presencia de monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) derivadas de estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas no solo de unidades H y G, típicas de ligninas de gimnospermas, sino también, en cuatro de las especies estudiadas (*Marchantia polymorpha*, *Isoetes histrix*, *Ceratopteris cornuta* y *Posidonia oceanica*), de aril-glicerol- β -aril éter estructuras derivadas de unidades S, que son típicas de ligninas de angiospermas, coexistiendo en la mayoría de las especies con estructuras estilbeno derivadas del alcohol coniferílico.

Tabla 3.16. Productos de degradación obtenidos por tioacidólisis de las paredes celulares de las especies vegetales estudiadas. Los valores se dan en corriente iónica total (TIC) $\times 10^{-8}$. Est: estructuras estilbeno; CAlc: alcohol coniferílico; CAld: coniferilaldehído; SAlc: alcohol sinapílico; SAld: sinapilaldehído; CmAlc: alcohol *p*-cumarílico; DHCA: alcohol dihidroconiferílico; V: vanillina; Tr: cantidades traza. La desviación estándar de los valores se encuentra dentro del 5% del valor de la media.

Especie	β -O-4					Est	O-4-end			
	CAlc	CAld	SAlc	SAld	CmAlc		CAlc	CAld	DHCA	V
1 <i>Marchantia polymorpha</i>	0,05	Tr	Tr	-	0,01	-	-	-	Tr	-
2 <i>Isoetes fluitans</i>	0,51	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-
3 <i>Isoetes histrix</i>	0,05	-	0,02	-	-	Tr	-	-	-	Tr
4 <i>Equisetum telmateia</i>	0,03	-	-	-	-	-	Tr	Tr	-	-
5 <i>Ceratopteris thalictroides</i>	0,04	-	-	-	-	Tr	-	-	-	-
6 <i>Ceratopteris cornuta</i>	0,09	Tr	0,08	-	Tr	Tr	-	-	-	-
7 <i>Phyllitis scolopendrium</i>	0,12	Tr	-	-	Tr	Tr	0,01	Tr	-	-
8 <i>Dryopteris affinis</i>	0,57	0,03	-	-	0,02	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01
9 <i>Pteridium aquilinum</i>	0,64	0,02	-	-	0,02	0,02	0,04	0,02	-	0,02
10 <i>Posidonia oceanica</i>	0,31	0,02	0,56	Tr	0,05	Tr	Tr	-	-	Tr

La tabla 3.17 incluye los resultados obtenidos en las especies en las que se detectó la presencia de ligninas. Salta a la vista, como principal característica, la casi universal presencia de estructuras aril-glicerol- β -aril éter derivadas del alcohol coniferílico, presentes en todas las especies, coniferilaldehído y alcohol *p*-cumarílico, ausentes en licófitos y esfenófitos (*Isoetes* y *Equisetum*). También muestra la presencia, de estructuras aril-glicerol- β -aril éter derivadas del sinapil alcohol, que fueron también observadas en todos los *phylla*, aunque de forma irregular. Mientras que las estructuras aril-glicerol- β -aril éter derivadas del sinapilaldehído fueron vistas solo en la angiosperma acuática estudiada (*Posidonia oceanica*).

Los análisis por tioacidólisis en esas especies también revelaron pequeñas cantidades de monómeros O-4-terminales (Tabla 3.17), principalmente derivados del alcohol coniferílico, coniferilaldehído y vanillina (Tabla 3.17), que fueron encontrados en cantidades cuantificables en los filicófitos *Dryopteris affinis* y *Pteridium aquilinum*, apareciendo en trazas de los mismos en el resto de las especies en las que fueron

detectados. Además, los análisis por tioacidolisis revelaron la ausencia de O-4-dihidroconiferil alcohol terminal (DHCA) (Figura 3.39), un monómero de lignina típico de gimnospermas (Lapierre y cols. 1995).

Como fue apuntado anteriormente, con la excepción de la vanillina, que puede aparecer del coniferilaldehído por medio de una reacción aldol en las paredes celulares (Kim y cols. 2002), se piensa que la mayor parte de los restantes grupos O-4 terminales actúan como puntos de nucleación (iniciación) para el crecimiento de la lignina, porque pueden aparecer solo del acoplamiento en la posición β de un radical monolignol con las especies de radicales fenólicos en la posición O-4 (Durbeej y Eriksson LA 2003). Estos radicales fenólicos O-4 podrían actuar como puntos de nucleación para que radicales de monolignoles puedan ser añadidos en sucesivos pasos, que permitirían el crecimiento de la red de lignina por sucesivas adiciones radical-radical (Durbeej y Eriksson 2003). La escasez de residuos O-4 terminales en las especies estudiadas nos indicaría, por lo tanto, que sus ligninas tienen pocos entrecruzamientos o, lo que es lo mismo, están formadas por cadenas lineales muy largas. Otra posibilidad es que el grado de condensación de las mismas sea muy grande, que la tioacidolisis no haya conseguido romper este empaquetamiento y que, por ello, se haya subestimado el número de unidades O-4 terminales presentes.

De acuerdo con este razonamiento, se puede esperar que la razón de monómeros unidos por enlaces β -O-4/monómeros O-4-terminales ($\Sigma \beta$ -O-4/ Σ O-4) refleje aproximadamente el grado de polimerización de la fracción lineal β -O-4 de las ligninas.

II.5. La proporción entre monómeros $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal y la composición monomérica

Cuando la proporción entre monómeros $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal de la fracción lineal de la lignina fue estudiada como función de la composición monomérica en este grupo de plantas terrestres diferencialmente evolucionadas, fue encontrada una relación estadísticamente significativa ($r^2 = 0,9282$) entre esta proporción y la proporción S/G de las ligninas (Figura 3.41). En otras palabras, la proporción entre monómeros $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal se incrementa cuando se incrementa la proporción de unidades S, independientemente de la cantidad total de monómeros que participan en los enlaces β -O-4. Esta conclusión puede fácilmente ser confirmada por los datos aportados en la Tabla 3.18, que muestra que especies con similares cantidades totales de monómeros participantes en los enlaces β -O-4, contienen ligninas con las menores y mayores valores, respectivamente.

Este resultado concuerda con nuestro conocimiento de la química de los radicales de alcohol sinapílico (Russell y cols. 1996): el único modo de acoplamiento de los radicales de alcohol sinapílico son los β - β y β -O-4, porque las únicas estructuras de resonancia posibles de los radicales de alcohol sinapílico son la R_{O4} y la R_{β} . Como el modo de acoplamiento β - β es menos favorecido que el modo de acoplamiento β -O-4 en el alcohol sinapílico a bajas concentraciones del radical (Russell y cols. 1996), casi

todos los recursos utilizados para la biosíntesis de ligninas son principalmente incorporados en polímeros ricos en enlaces β -O-4. Este razonamiento químico podría fácilmente explicar por que el uso de alcohol sinapílico para la biosíntesis de lignina permite a la fracción lineal alcanzar un máximo de proporción de monómeros $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal independientemente de la cantidad total de monómeros que participan en los enlaces $\Sigma\beta$ -O-4. En apoyo de un control puramente químico de la proporción de monómeros $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal de la fracción lineal de lignina, podría ser mencionado que dehidropolímeros terminales (DHPs terminales) preparados por copolimerización de alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico (en una proporción molar 1:1), y de copolimerización de alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (en proporción molar 1:1:1) produjeron DHPs con proporciones $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal de 6 a 27 (Jacquet y cols. 1997), que están en el rango de los encontrados in vivo (Figura 3.41). Estos resultados sugieren firmemente la existencia de un exclusivo y puramente químico control de la proporción de monómeros $\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4 terminal de la fracción lineal de la lignina, en la que la disponibilidad y posterior incorporación de residuos S alarga consecuentemente la cadena lineal β -O-4.

Tabla 3.17. Relaciones entre el tipo y la razón de los monómeros, así como razones entre los distintos tipos de enlaces presentes en las ligninas del xilema y de los cultivos celulares.

	<i>Muestra</i>	<i>S/G</i>	$\Sigma\beta$ -O-4	Σ O-4	$\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4
1	<i>Marchantia polymorpha</i>	0	0,062	0,001 ¹	62
2	<i>Isoetes fluitans</i>	0	0,511	0,010	51
3	<i>Isoetes histrix</i>	0,37	0,070	0,002 ¹	35
4	<i>Equisetum telmateia</i>	0	0,030	0,002 ¹	15
5	<i>Ceratopteris thalictroides</i>	0	0,040	0,001 ¹	40
6	<i>Ceratopteris cornuta</i>	0,94	0,172	0,001 ¹	172
7	<i>Phyllitis scolopendrium</i>	0	0,122	0,012	10
8	<i>Dryopteris affinis</i>	0	0,620	0,090	7
9	<i>Pteridium aquilinum</i>	0	0,680	0,100	7
10	<i>Posidonia oceanica</i>	2,06	0,971	0,003 ¹	324

¹Valores aproximados

El razonamiento anterior es válido para angiospermas (Gómez-Ros cols. 2007a). Sin embargo, es necesario ser cautos en la generalización del mismo a las especies basales de este estudio por su bajo, o nulo, contenido en residuos S. Estas especies se agrupan en el origen del eje x donde son representados los valores de la proporción S/G (Figura 3.41).

Estos resultados sugieren la existencia de un control puramente químico del grado de polimerización de las ligninas, lo que indica que el grado de polimerización de la fracción lineal depende íntimamente de la composición de monómeros, y por lo tanto de la naturaleza química de los radicales derivados de los tres monolignoles

(alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico), cuya eficacia ha sido finamente templada durante la evolución de las plantas vasculares terrestres.

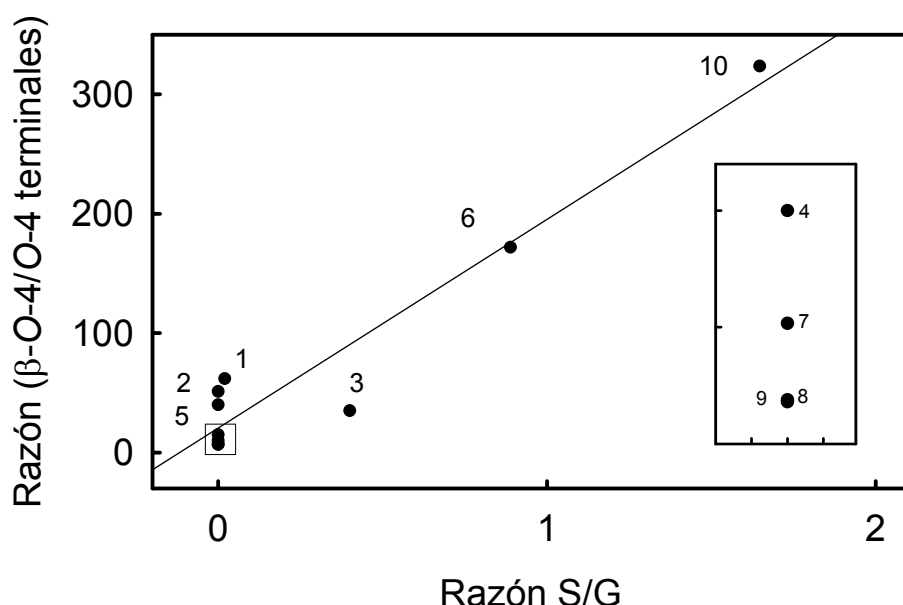


Figura 3.37. Dependencia del grado de polimerización estimado como la razón $\Sigma \beta\text{-O-4}/\Sigma \text{O-4 terminales}$ de la razón S/G de la fracción lineal $\beta\text{-O-4}$ de las ligninas en las especies vegetales estudiadas. Las especies se numeran de acuerdo a la tabla 3.17. Las desviaciones estándar se encuentran ocultas por los símbolos.

III. Estudio de la enzima peroxidasa

III.1. La actividad peroxidasa

Aunque las peroxidasas son enzimas distribuidas ubicuamente en todo el reino vegetal, su papel en los procesos de lignificación implica necesariamente que han de ser capaces de utilizar como substratos los monolignoles que polimerizados darán lugar a las ligninas. Dado que las ligninas son de tipo G o de tipo S, dependiendo del tipo de unidades que predominan en la constitución de las mismas, las peroxidasas se pueden clasificar de la misma forma en función del tipo de lignina que son capaces de polimerizar, denominándose guayacil-peroxidasa o siringil-peroxidasa.

Como se ha indicado anteriormente, las ligninas presentes en las plantas vasculares terrestres son diferentes, en las de angiospermas predominan las unidades S mientras que en las de gimnospermas lo hacen las unidades G. Esta distinción no es absoluta ni excluyente ya que hay gimnospermas y lycopodios que tienen ligninas con unidades S. Sería de gran importancia para la planta disponer de una peroxidasa capaz de oxidar tanto el alcohol coniferílico como el sinapílico lo que haría menos costoso el proceso de formación de las ligninas. Si esto fuese así, esta peroxidasa debería de haberse conservado durante toda la evolución vegetal. Para comprobar esta posibilidad se midió la actividad peroxidasa total en todas las especies y la

actividad peroxidasa en el fluido intercelular de cinco de ellas (*Isoetes fluitans*, *Equisetum telmateia*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis* y *Pteridium aquilinum*).

Tabla 3.18. Actividad peroxidasa medida en las diferentes especies estudiadas. Actividad enzimática total (A) y actividad enzimática en el fluido intercelular (B). ¹ Datos de Gómez-Ros 2007a.

Especie	Actividad peroxidasa (nkat g ⁻¹ PF)					Siringaldazina
	4MN	Alcohol coniferílico	Alcohol sinapílico	Coniferil- aldehído	Sinapil- aldehído	
1 <i>M. stellatus</i> (A)	---	---	---	---	---	---
2 <i>U. rigida</i> (A)	---	---	0,18 ± 0,13	---	---	0,17 ± 0,09
3 <i>C. baccata</i> (A)	---	0,53 ± 0,07	3,17 ± 0,20	7,07 ± 0,35	0,95 ± 0,11	0,16 ± 0,05
4 <i>M. polymorpha</i> (A)	9,49 ± 1,89	35,56 ± 0,17	---	18,53 ± 1,03	0,81 ± 0,34	3,74 ± 0,52
5 <i>P. patens</i> (A)	1,41 ± 0,04	1,80 ± 1,24	1,75 ± 0,31	4,34 ± 0,50	1,09 ± 0,04	0,20 ± 0,13
6 <i>I. fluitans</i> (A)	35,92 ± 0,52	54,56 ± 6,40	0,51 ± 0,15	22,90 ± 0,61	0,34 ± 0,03	0,17 ± 0,05
7 <i>I. fluitans</i> (B)	5,49 ± 0,70	9,23 ± 1,22	---	9,55 ± 1,31	---	0,04 ± 0,02
8 <i>I. histrix</i> (A)	0,16 ± 0,01	1,23 ± 0,06	---	0,70 ± 0,17	---	---
9 <i>S. martensii</i> (A)	201,11 ± 29,96 ¹	956,02 ± 8,85 ¹	81,31 ± 1,99 ¹	798,98 ± 49,20 ¹	53,02 ± 6,10 ¹	---
10 <i>E. telmateia</i> (A)	36,45 ± 2,59	22,01 ± 0,88	0,20 ± 0,34	7,49 ± 0,59	1,61 ± 0,35	---
11 <i>E. telmateia</i> (B)	3,35 ± 0,34	9,31 ± 0,98	---	11,46 ± 1,31	---	0,23 ± 0,03
12 <i>C. thalictroides</i> (A)	1,86 ± 0,33	7,90 ± 0,82	---	4,00 ± 0,87	0,21 ± 0,01	0,09 ± 0,01
13 <i>C. cornuta</i> (A)	12,10 ± 0,17	20,78 ± 2,38	0,23 ± 0,06	14,53 ± 0,42	---	0,31 ± 0,11
14 <i>P. scolopendrium</i> (A)	---	0,13 ± 0,03	---	---	---	0,09 ± 0,01
15 <i>P. scolopendrium</i> (B)	0,02 ± 0,002	0,19 ± 0,01	---	0,22 ± 0,04	---	---
16 <i>D. affinis</i> (A)	0,54 ± 0,13	1,29 ± 0,01	0,54 ± 0,05	0,59 ± 0,09	---	---
17 <i>D. affinis</i> (B)	---	---	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	---	0,03 ± 0,02
18 <i>P. aquilinum</i> (A)	4,82 ± 0,01	12,86 ± 0,82	1,58 ± 0,36	10,59 ± 0,24	---	0,54 ± 0,18
17 <i>P. aquilinum</i> (B)	0,34 ± 0,02	2,05 ± 0,12	---	2,90 ± 0,26	---	0,11 ± 0,02
20 <i>P. oceanica</i> (A)	47,88 ± 1,55	87,02 ± 3,09	2,99 ± 0,41	48,84 ± 0,80	0,32 ± 0,08	3,93 ± 0,23

Para poder conocer el tipo de peroxidasa presente en las especies estudiadas, y así saber el tipo de lignina que son capaces de sintetizar, se midió la actividad enzimática, con los cuatro substratos naturales, los alcoholes y aldehídos coniferílico y sinapílico, y con dos substratos artificiales, el 4MN y la siringaldazina (Tabla 3.1).

Los resultados muestran que las peroxidasas extraídas oxidaron no solo el alcohol coniferílico y el coniferilaldehído, sino también el alcohol sinapílico y el sinapilaldehído (Tabla 3.1), independientemente de la presencia de unidades S en las correspondientes ligninas. Aparentemente, no mostraron restricciones estéricas durante la catálisis, ya que también fueron capaces de oxidar sustratos no fisiológicos, como la siringaldazina y el 4MN.

Entre las algas, *Mastocarpus stellatus* no presenta actividad peroxidasa, *Ulva rigida* solo es capaz de oxidar al alcohol coniferílico (entre los substratos naturales),

siendo *Cystoseira baccata* (un alga parda) la única que presenta actividad con todos los substratos naturales.

Entre las plantas terrestres basales, *Marchantia polymorpha*, una hepática que depende totalmente del agua y que forma parte del grupo de los más antiguos colonizadores de la tierra, es capaz de oxidar a todos los substratos excepto al alcohol sinapílico, mientras que *Physcomitrella patens*, un musgo, los oxida todos aunque con bajos niveles de actividad enzimática.

Los licófitos presentan actividades enzimáticas muy dispares, mientras que las dos especies de *Isoetes* tienen una actividad mucho menor que *Sellaginella martensii* que tiene la actividad más alta de entre todas las especies estudiadas. Los licófitos estudiados son, en general, capaces de oxidar todos los substratos naturales a excepción de *Isoetes hystrix* que es incapaz de oxidar el alcohol y el aldehído sinapílicos.

Por su parte, el esfenófito *Equisetum telmateia* es capaz de oxidar a todos los substratos naturales, mostrando mayor actividad junto a los grupos guaiacilo.

Los filicófitos (verdaderos helechos) oxidan a los alcoholes y aldehídos coniferílicos y no lo hacen con el alcohol sinapílico, ni *Ceratopteris thalictroides* ni *Phyllitis scolopendrium*, ni con el sinapilaldehído, que solo es oxidado por *Ceratopteris thalictroides*.

Los resultados obtenidos con la única angiosperma estudiada, *Posidonia oceanica*, son similares a los obtenidos con otras angiospermas, ya que las peroxidasas de esta especie son capaces de oxidar todos los substratos, fisiológicos y no fisiológicos.

En algunos casos -y para algunos substratos- las actividades enzimáticas medidas con el fluido intercelular son superiores a las medidas en la fracción total (*Equisetum telmateia*, *Phyllitis scolopendrium* y *Dryopteris affinis*), lo que puede ser debido a la presencia de sustancias, como por ejemplo diferentes compuestos de naturaleza fenólica, que interfieren con la medida de la actividad peroxidasa total. Este hecho puede significar que en las especies donde esto ocurre se está infravalorando el nivel de actividad enzimática.

Es de destacar el hecho de que las algas *Cystoseira baccata* (Cystoseiraceae) y *Ulva rigida* (Ulvaceae), el licófito *Isoetes fluitans* (Isoetaceae), el esfenófito *Equisetum telmateia* (Equisetaceae) y los filicófitos *Dryopteris affinis* (Driopteraceae) y *Pteridium aquilinum* (Pteridiaceae) disponen de peroxidasas capaces de oxidar grupos siringilo (Tabla 3.1) a pesar de la ausencia de ligninas tipo S (Tabla 3.4). Resultados similares se han descrito para peroxidasas aisladas de las gimnospermas *Picea abies* (Marjamaa y cols. 2006), *Cryptomeria japonica* (L.F.) Don (Tsutsumi y cols. 1998), *Picea sitchensis* (McDougall 2001), *Cupressus sempervirens* (Cupressaceae), *Thuja orientalis* (Taxaceae) y *Pinus halepensis* (Pinaceae) (Gomez Ros y cols. 2007a), que mostraron peroxidasas capaces de oxidar grupos siringilo a pesar de la ausencia, o casi ausencia, de ligninas de tipo S.

Más de destacar es el hecho de que *Physcomitrella patens* un musgo de la familia Funariaceae, que no lignifica (Tabla 3.4), dispone de peroxidasas capaces de oxidar grupos siringilo y grupos guaiacilo (Tabla 3.1).

Estos resultados muestran una irregular, pero amplia, distribución de las siringil-peroxidasas en los grupos vegetales estudiados, lo que haría innecesaria la presencia de "una lanzadera" de alcohol coniferílico para oxidar las unidades S, tal como ha sido descrito por algunos autores (Takahama y cols. 1996). Por otra parte, algunas de las especies estudiadas, que no disponen de peroxidasas capaces de oxidar grupos siringilo sí tienen ligninas de tipo S. Tal es el caso de la hepática *Marchantia polymorpha* (Marchantiaceae) y del licófito *Isoetes hystrix* (Isoetaceae), lo que apoyaría la hipótesis de la "lanzadera" de alcohol coniferílico descrita. A este respecto, en estudios recientes de nuestro laboratorio, se ha comprobado como la adición de alcohol coniferílico al medio de reacción, incrementaba la formación de polímeros de deshidrogenación del alcohol sinapílico en más de cinco veces (Novo Uzal, comunicación personal).

La condición de angiosperma marina de *Posidonia oceanica* (Posidoniaceae) permitía predecir su capacidad para oxidar grupos siringilo y guaiacilo, y el tipo de ligninas de los que dispone (G/S) (Tabla 3.4). No obstante, los niveles de actividad enzimática medidos en esta especie son bajos.

III.2. Patrón isoenzimático de peroxidasas

La siringil-peroxidasa mejor caracterizada es la de *Zinnia elegans*, la cual ha sido purificada y clonada (Gabaldón y cols. 2005), habiéndose caracterizado también los polímeros que resultan de la oxidación del alcohol sinapílico por esta enzima (Gabaldón y cols. 2005). Por este motivo, se desarrolló un método rápido de búsqueda de isoenzimas homólogas a esta peroxidasa en las diferentes especies vegetales objeto de estudio. Las isoenzimas se analizaron por isoelectroenfoque (IEF), ya que el punto isoelectroforético, pI, está determinado por el balance entre los aminoácidos básicos y ácidos de una proteína, y refleja las semejanzas en la composición/proporción de aminoácidos de las isoenzimas.

Los patrones de isoenzimas de la peroxidasa obtenidos por IEF en placa - en el que el enfoque de las proteínas tiene lugar por migración sobre la superficie del gel - (Figura 3.4) mostraron la dispar presencia de isoenzimas no sólo análogas (isoenzimas de movilidad similar en el IEF), sino también homólogas (isoenzimas de idéntica movilidad en el IEF) a la isoenzima básica de peroxidasa de *Zinnia elegans*. Así, peroxidasas homólogas a esta isoenzima básica se encontraron en la hepática *Marchantia polymorpha* (Marchantiaceae), el musgo *Physcomitrella patens* (Funariaceae), y los licófitos *Isoetes hystrix* (Isoetaceae) y *Selaginella martensii* (Selaginellaceae). No aparecen en las algas, el resto de los helechos (esfenófitos y filicófitos) y la angiosperma marina (monocotiledónea).

Con anterioridad se han encontrado peroxidasas homólogas a esta isoenzima básica en gimnospermas como *Cycas revoluta*, *Ginkgo biloba*, *Araucaria heterophylla*,

Cupressus sempervirens, *Thuja orientalis*, *Taxus baccata*, *Pinus halepensis* y *Ephedra viridis* y en el licófito *Selaginella martensii* (Gomez Ros y cols. 2007a), resultados que coinciden con la observación anterior de que las peroxidadas básicas constituyen la principal población de isoenzimas en algunas gimnospermas, como *Araucaria araucana* (Riquelme y Cardemil 1993), *Picea abies* (Koutaniemi y cols. 2005) y *Pinus sylvestris* (Tarkka y cols. 2001).

Isoenzimas homólogas a la peroxidasa de *Zinnia elegans* no sólo se encuentran en gimnospermas y licófitos, sino también en angiospermas. Se han encontrado en eudicotiledóneas como *Magnolia grandiflora* L., *Betula pendula* Roth, *Populus alba*, *Citrus aurantium* L., *Catharantus roseus* y *Medicago sativa* L.; y en monocotiledóneas como *Dypsis lutescens* Wendl., *Juncus maritimus* Lam, *Dracaena draco*, *Narcissus tazetta* L., *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, *Washingtonia filifera* (Lindl.) Wendl y *Asparagus setaceus* (Kunth) Jessop (Gómez-Ros y cols. 2007b), entre otras.

En las especies objeto de nuestro estudio, las peroxidadas básicas homólogas a las de *Zinnia* constituyen una minoría, están presentes, en los grupos más basales, en hepáticas, musgos y licófitos. Por el contrario están ausentes en el resto de los traqueófitos basales (esfenófitos y filicófitos) y en la angiosperma acuática.

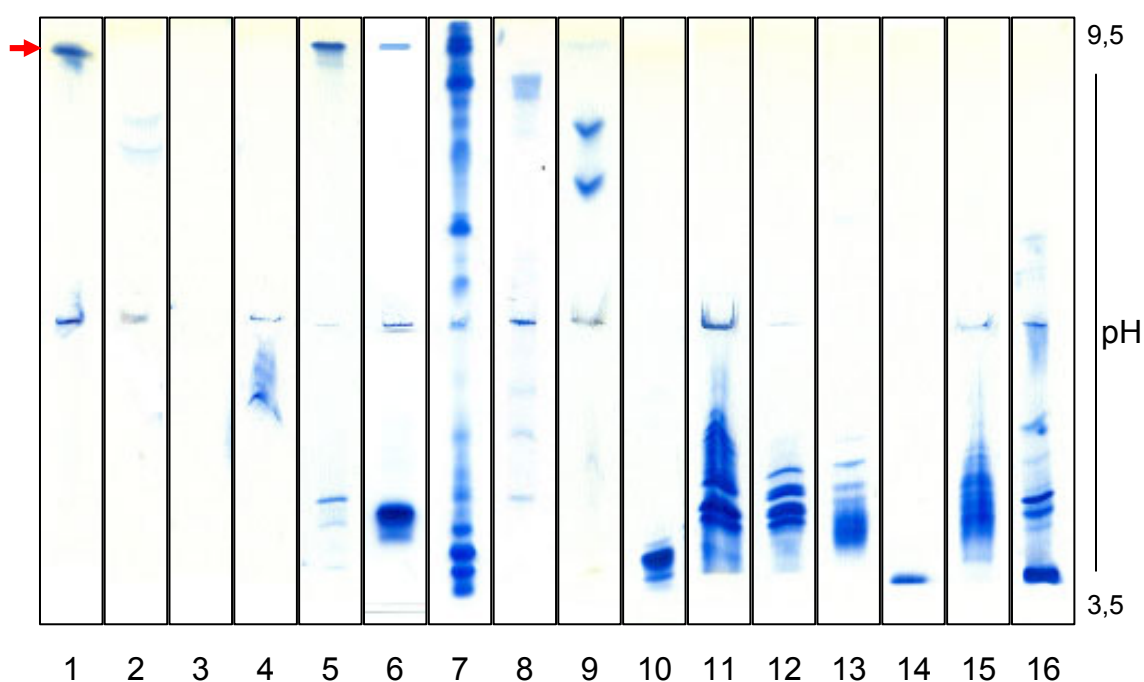


Figura 3.38. Isoelectroenfoque en equilibrio de la fracción soluble de las especies sometidas a estudio: *Zinnia elegans* (1), *Mastocarpus stellatus* (2), *Ulva rigida* (3), *Cystoseira baccata* (4), *Marchantia polymorpha* (5), *Physcomitrella patens* (6), *Selaginella martensii* (7), *Isoetes fluitans* (8), *Isoetes hixrix* (9), *Equisetum telmateia* (10), *Ceratopteris thalictroides* (11), *Ceratopteris cornuta* (12), *Phyllitis scolopendrium* (13), *Dryopteris affinis* (14), *Pteridium aquilinum* (15) y *Posidonia oceanica* (16). La tinción fue realizada con 4MN y H_2O_2 . La flecha indica la posición de las peroxidadas homólogas a la isoenzima básica de *Zinnia elegans*.

En todos los grupos aparecen isoenzimas desde extremadamente ácidas hasta isoenzimas de punto isoeléctrico neutro, con variados y complejos patrones.

Las algas *Mastocarpus stellatus* y *Cystoseira baccata* presentan también isoformas de peroxidasa lo que puede ser considerado como una prueba más de la universal distribución de esta enzima. Es destacable también que en la especie *Mastocarpus stellatus* aparecen isoenzimas de peroxidasa, concretamente dos básicas que serían las responsables de la actividad detectada espectrofotométricamente.

Si comparamos los resultados del IEF (Figura 3.4) con los de actividad enzimática (Tabla 3.1) podemos comprobar como *Marchantia polymorpha* tiene una isoenzima básica homóloga a la de *Zinnia elegans* pero no es capaz de oxidar el alcohol sinapílico aunque sí el sinapilaldehído; *Physcomitrella patens* y *Selaginella martensii* también tienen una isoenzima de igual pI y son capaces de oxidar tanto al alcohol sinapílico como al sinapilaldehído; por último, *Isoetes hystrix* tiene la misma isoenzima y no es capaz de oxidar ni al alcohol sinapílico, ni al sinapilaldehído.

Es evidente que aún disponiendo de isoenzimas homólogas las capacidades oxidativas de las mismas con los distintos sustratos son diferentes. La capacidad para oxidar alcohol sinapílico y sinapilaldehído está más ampliamente extendida -entre las especies objeto de nuestro estudio- que la presencia de isoenzimas básicas homólogas a la de *Z. elegans*. Así, solo *Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens* y *Selaginella martensii* presentan al mismo tiempo capacidad para oxidar los sustratos citados y una isoenzima homóloga a la de *Z. elegans*.

Varias especies (*Cystoseira baccata*, *Ulva rigida*, *Isoetes fluitans*, *Equisetum telmateia*, *Ceratopteris thalictroides*, *Ceratopteris cornuta*, *Dryopteris affinis*, *Pteridium aquilinum* y *Posidonia oceanica*) son capaces de oxidar uno, al menos, de los sustratos citados, aún cuando no disponen de la isoenzima básica homóloga a la de *Z. elegans*, por lo que tal oxidación ha de ser catalizada por otra isoenzima.

Al mismo tiempo en *Isoetes hystrix* se da la situación contraria, dispone de la isoenzima básica homóloga a la de *Z. elegans* pero no es capaz de oxidar, ni al alcohol sinapílico, ni al sinapilaldehído.

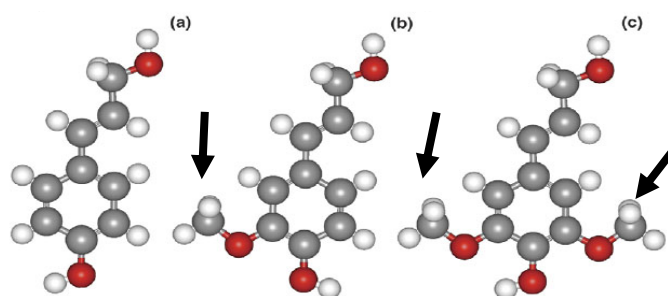


Figura 3.39. Estructura de los tres monolignoles mostrando la situación de los grupos metoxilo que condicionan la posibilidad de unión al grupo prostético de la isoenzima de peroxidasa. (a) alcohol *p*-cumarílico, (b) alcohol coniferílico y (c) alcohol sinapílico. Las flechas señalan la posición de los grupos metoxilo.

Con anterioridad se ha establecido (Ros Barceló y cols. 2004) que tanto las isoenzimas básicas como las ácidas son capaces de oxidar alcohol coniferílico. Sin

embargo, esta situación no está tan clara en el caso del alcohol sinápico. En este caso, las peroxidasas ácidas, con algunas excepciones (Christensen y cols. 1998), son vistas como pobres catalizadores. Esto estaría motivado por la exclusión de sustrato del centro catalítico de la enzima originado por las dificultades estéricas de acoplamiento creadas por los grupos metoxilo del alcohol sinápico (Figura 3.5) y los residuos I-138 y P-139 del sitio de unión del sustrato a la enzima (Figura 3.6). La hélice D', presente en la peroxidasa G de *Arabidopsis thaliana* está ausente de la peroxidasa S de *Zinnia elegans* y de todas las peroxidasas S descritas (Gomez-Ros y cols. 2007b). Este cambio, junto con otros, origina cambios estructurales en el centro catalítico que impiden al alcohol sinápico el acoplamiento en el mismo. Por el contrario, la estructura de la enzima permite, en *Z. elegans*, un relajamiento del centro catalítico, lo que facilita el acceso de los grupos siringilo (que poseen dos substituyentes metoxilo en las posiciones 3 y 5). Esta característica es propia de todas las peroxidasas de tipo S.

Una posible explicación para los resultados obtenidos en las especies sometidas a estudio, puede ser que hay isoenzimas ácidas de peroxidasa que son capaces de oxidar alcohol sinápico, a pesar de las posibles restricciones estéricas apuntadas, lo que implicaría un comportamiento excepcional, como el apuntado por Christensen y cols. (1998).

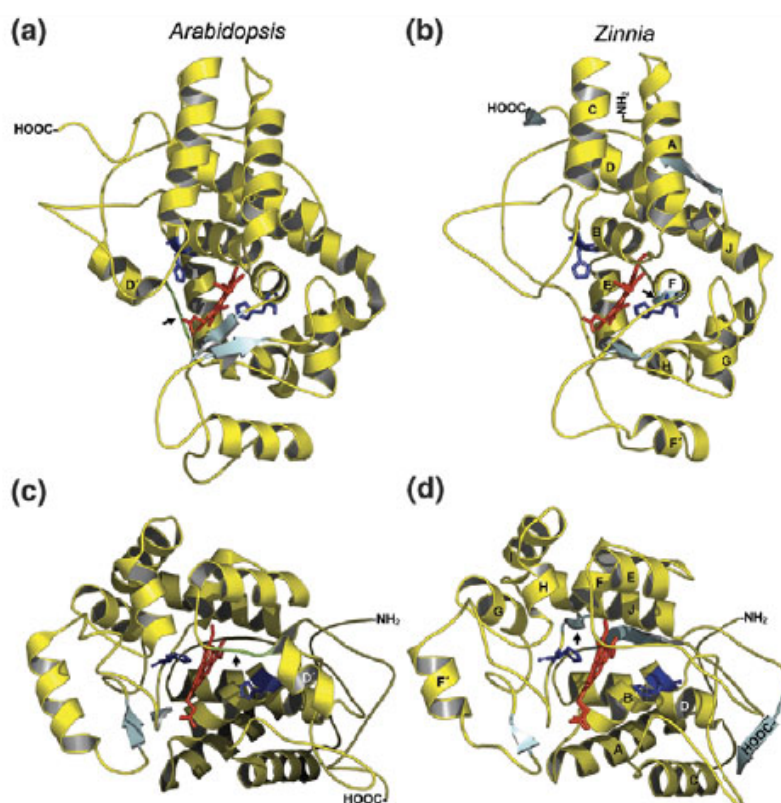


Figura 3.40. Hipotética estructura tridimensional de la ATP A2 peroxidasa de tipo G (a) y (c) y la peroxidasa de tipo S (b) y (d). Ambas peroxidasas muestran como característica común el posicionamiento invariable de las α -hélices, A, B, C, E, F, F', H, I y J (en amarillo) pero también algunas diferencias significativas. En rojo aparece señalado el grupo prostético. Tomado de Ros Barceló y cols. 2007.

Por otra parte, en trabajos recientes (Novo Uzal 2008), se ha comprobado como suspensiones celulares de *Ginkgo biloba* modifican notablemente su patrón isoenzimático, lo que indica que se expresan genes que no lo hacen en el xilema de la planta (Figura 3.7). Se confirmaría que el genoma de las células de *Ginkgo biloba*, idéntico "*in vivo*" e "*in vitro*", se expresa de forma diferente dependiendo de las condiciones en las que se encuentra. Esto implicaría una fuerte regulación de la expresión de las peroxidadas y apoyaría la idea de la presencia de peroxidadas capaces de oxidar alcohol sinapílico, y por lo tanto con capacidad de producir unidades siríngilo (S) en los procesos de lignificación, desde antes de que las plantas empezasen a producirlas. Lo que justificaría la presencia de las mismas en todos los grupos vegetales, desde las algas hasta las angiospermas más evolucionadas.

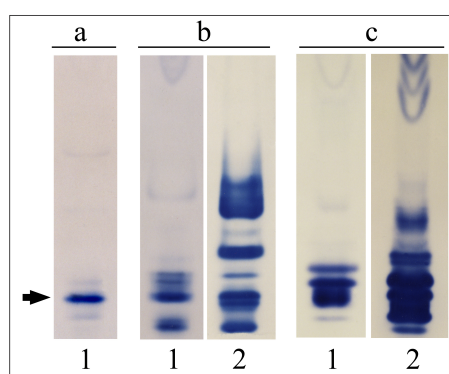


Figura 3.41. Patrones de isoenzimas de peroxidasa obtenidos por IEF de la proteína extracelular de tallos (1) y de cultivos celulares (2) de *Zinnia elegans* (a), *Ginkgo biloba* (b) y *Betula pendula* (c); después de teñir con 4-MN y H₂O₂. La flecha señala las peroxidadas homólogas a la peroxidasa de *Zinnia elegans*. De Novo Uzal (2008).

IV. Valoración integrada de la actividad peroxidasa y la lignificación

La integración de los resultados ofrecidos hasta este momento permite hacer una serie de consideraciones que relacionen los que corresponden al estudio de las peroxidadas y aquellos que reflejan las características y composición de las ligninas.

Todas las especies estudiadas, con excepción de las algas *Mastocarpus stellatus* y *Ulva rigida* presentan actividad peroxidasa capaz de oxidar alguno o todos los sustratos naturales que se asume participan en el proceso de lignificación (Tabla 3.1). Incluso el alga parda *Cystoseira baccata* oxida los alcoholes y aldehídos coniferílico y sinapílico. Esto se podría interpretar presumiendo que los mecanismos enzimáticos que participan en la lignificación están presentes en el mundo vegetal a lo largo de toda su historia evolutiva, incluso antes de colonizar la tierra y sin que sepamos a que se dedicaba ese mecanismo enzimático.

Con anterioridad se ha descrito la existencia de actividad peroxidasa en algas del orden de las Charales (Bakalovic y cols. 2006).

Solo cuatro de las especies estudiadas (*Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens*, *Selaginella martensii* e *Isoetes histrix*) presentan en su patrón enzimático (Figura 3.4) homólogos de la isoenzima básica de *Zinnia elegans*, única peroxidasa que esta angiosperma posee y que necesariamente está implicada en sus procesos de lignificación, de la que se sabe que es capaz de oxidar grupos siringilo y dar lugar así a ligninas de tipo S.

Marchantia polymorpha, una hepática, planta basal considerada de las primeras colonizadoras de la tierra, que aún no se independizó totalmente del medio acuático, dispone de isoenzimas de peroxidasa (Figura 3.4) ácidas y básicas (entre las que está la homóloga de la de *Z. elegans*) que no oxidan al alcohol sinapílico pero sí al sinapilaldehído (Tabla 3.1) y producen ligninas de tipo G (Tabla 3.16) en las que se encuentran unidades S (6% del total).

Physcomitrella patens, un pequeño musgo, es capaz de oxidar todos sustratos naturales y artificiales (Tabla 3.1) empleados con alguna de las isoenzimas de peroxidasa que posee (Figura 3.4) entre las que posee una básica homóloga a la de *Z. elegans* y, sin embargo, no lignifica (Tabla 3.16).

Gómez-Ros y cols. (2007a) ha descrito con anterioridad las características del licófito *Selaginella martensii*. Tiene una importante actividad enzimática (Tabla 3.1) con todos los sustratos naturales y con el 4MN y un patrón isoenzimático (Figura 3.4) que incluye a la peroxidasa básica homóloga a la de *Zinnia elegans*, y produce ligninas tipo S con un elevado porcentaje de unidades siringilo (Tabla 3.16).

Isoetes histrix también es un licófito, próximo filogenéticamente a *Selaginella martensii*, dispone en su patrón enzimático de isoenzimas básicas (Figura 3.4), incluida la homóloga a la de *Zinnia*, que no es capaz de oxidar ni al alcohol ni al aldehído sinapílico (Tabla 3.1) y que, sin embargo, produce ligninas que, aunque debemos considerarlas de tipo G, tienen una elevada proporción (27%) de unidades S (Tabla 3.16).

Por otra parte hay, entre las estudiadas, especies que son capaces de oxidar al alcohol sinapílico o al sinapilaldehído (Tabla 3.1) y que, sin embargo, no disponen de isoenzimas básicas (Figura 3.4) y que sus ligninas no contienen grupos siringilo (Tabla 3.16). Tal es el caso de *Isoetes fluitans*, *Equisetum telmateia*, *Ceratopteris thalictroides*, *Dryopteris affinis*, *Pteridium aquilinum* y *Posidonia oceanica*.

Hay además, una especie, *Ceratopteris cornuta*, que es capaz de oxidar al alcohol sinapílico (Tabla 3.1), que en sus ligninas contiene unidades S en proporción importante (Tabla 3.16) y que no dispone de ninguna isoenzima básica (Figura 3.4).

Tanto las peroxidasas básicas como las ácidas son capaces de oxidar alcohol *p*-cumarílico y coniferílico, pero, mientras las básicas son también capaces de oxidar alcohol sinapílico, las peroxidasas ácidas típicas, con algunas excepciones (Quiroga y cols. 2000), son en general vistas como pobres catalizadores con este sustrato (Nielsen y cols. 2001). El papel real de cada isoenzima de peroxidasa en la biosíntesis de lignina está determinado por la posible acomodación del sustrato al centro catalítico de la enzima (Kobayashi y cols. 2001) aunque la hidrofobicidad del sustrato también ha de ser considerada (Kobayashi y cols. 2005).

Se sabe que las versátiles peroxidasas, con un amplio rango de especificidad de sustrato para metabolitos *p*-hidroxifenilpropanoides (Tutschek 1979, Speicher y cols. 2003), están localizadas en la pared primaria de hepáticas (Ishida y cols. 1985) y en los engrosamientos no lignificados de clorocitos, que los protegen del colapso de los hidrocitos adyacentes en los musgos (Wächter y cols. 1987).

Los patrones de producción de peroxidasa (Figuras 3.1, 3.2 y 3.3), así como los de deposición de ligninas (Figuras 3.5, 3.6 y 3.7) de las especies estudiadas describen una evolución en los tejidos conductores de las mismas desde modelos más simples como en el caso de los licófitos, casi exclusivamente un cordón central formando una plectostela, a otros mucho más complejos como la eustela de *Equisetum telmateia*, o la dictiostela de *Pteridium aquilinum*, pero también, en algunos casos (*Selaginella martensii* o *Pteridium aquilinum*) que producen peroxidasas o lignifican fuera de los tejidos conductores, ya sea con fines defensivos o de sostén. Hay que tener en cuenta que tanto *Selaginella* como *Pteridium* son dos géneros que disponen en su xilema de vasos conductores, ya sea coexistiendo con traqueidas o como únicos elementos de sus tejidos conductores (Carlquist y Schneider 2001).

En este contexto, la observación de que, en las plantas con flores, las peroxidasas de tipo S están potestativamente localizadas en los engrosamientos de las fibras lignificadas del xilema, que no están implicadas en el transporte (Ros Barceló y cols. 2000), parece representar una herencia de sus orígenes en células vivas no lignificadas de un linaje ancestral de plantas terrestres, un carácter enzimático que sobrevive en las gruesas paredes no lignificadas de células vivas de musgos.

La expresión diferencial de las peroxidasas podría explicarse a través de cambios en la regulación transcripcional de la lignificación, principalmente en lo que afecta a los factores de transcripción (Patzlaff y cols. 2003, Newman y cols. 2004, Rogers y cols. 2005). Lo que motivaría que cada especie exprese diferentes isoenzimas con las evidentes repercusiones que esto tendría en los patrones de lignificación.

Parece claro que la capacidad de sintetizar unidades S está latente en el xilema de varias de las especies estudiadas, pertenecientes a grupos muy diferentes y distantes desde el punto de vista filogenético. En todo caso estos resultados están de acuerdo con el hecho de que las peroxidasas capaces de oxidar los grupos siringilo están presentes desde las especies más ancestrales hasta las especies más evolucionadas (Gómez-Ros y cols. 2006; Ros Barceló y cols. 2007).

Una consideración especial merece la confirmación de que la monocotiledónea marina *Posidonia oceanica* disponga de las ligninas típicas de angiospermas (Tabla 3.16).

La habilidad para sintetizar ligninas es considerada un paso crucial en la evolución de las plantas terrestres para conseguir rigidez para sus tejidos. Es destacable que esta característica haya sido retenida en angiospermas que han vuelto al mar, o que nunca lo han abandonado, mientras que otros organismos marinos como las macroalgas no contienen lignina (Klap y cols. 2000).

No carece de sentido preguntarse para que conserva la tan costosa maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de ligninas una planta que no precisa de ella para su sostén y cual es la ventaja de tener inmovilizada una gran cantidad de carbono.

Como consecuencia de su existencia sumergida, las plantas marinas a menudo tienen dificultad para mantener un balance positivo de carbón (Hemminga 1998). Esta sería ya una razón que justificaría el cese de la lignificación en las mismas. Además, ya ha transcurrido el tiempo suficiente (aproximadamente 100 millones de años) desde que estas plantas volvieron al mar, si es que alguna vez lo abandonaron, para adaptarse y cesar en su lignificación. Sin embargo *Posidonia oceanica* tiene ligninas.

La presencia de ligninas reporta a la planta ventajas y desventajas. Protege su sistema lacunal, sistema de canales que permite la difusión de oxígeno (Larkum y cols. 1989), respuesta a infecciones microbianas como ha sido descrito en plantas terrestres (Amer y Drew 1980, Benner y cols. 1984, Matern y cols. 1995, Hawkins y Boudet 1996), pero también, por el contrario, pérdida de elasticidad (Brett y Waldron 1990).

El hecho de que las plantas marinas, tan abundantes como *Posidonia oceanica* que ocupa grandes extensiones de fondos marinos, tengan ligninas tiene importancia para la ecología marina en la que la lignina es usada como marcador para estudiar la deriva de plantas terrestres. En lugares donde abunden plantas marinas con lignina esto deja de ser apropiado (Klap y cols. 2000).

Todo lo anteriormente indicado sugiere que las peroxidasas de tipo S no son tan excepcionales como previamente se había creído, ya que los motivos estructurales característicos de las mismas, aparecen en angiospermas, gimnospermas, helechos, licopodios, musgos y hepáticas. Su presencia precede no solo a la divergencia angiospermas-gimnospermas sino también a la radiación de los traqueófitos. Esta observación sugiere que los genes que codifican esas enzimas preceden a la aparición de las plantas vasculares (Gómez-Ros y cols. 2006, Duroux y Welinder, 2003) y pueden ser contemporáneas de la adquisición de los primitivos sistemas de transporte de agua y nutrientes a corta distancia que coevolucionaron con musgos y hepáticas (Ligrone y cols. 2000).

Como la principal característica de las peroxidasas S es la ausencia de restricciones estéricas en el punto de unión del sustrato (Gabaldón y cols. 2006), estas observaciones apoyan la existencia de un modelo básico ancestral de arquitectura y función de la pared celular, que podría haber evolucionado antes de la divergencia evolutiva de briófitos, helechos y plantas con semillas (Gómez-Ros y cols. 2006, Ligrone y cols. 2002), y que ha sido puesto a punto en respuesta a presiones evolutivas. En este modelo, las peroxidasas G constituyen el estado más evolucionado, como podría ser esperado de las restricciones que aparecen al aumentar la especificidad enzimática durante la evolución.

Es necesario obtener más información sobre el papel fisiológico de las peroxidasas de tipo S, y estudiar los efectos de las supresiones antisentido de peroxidasas S en plantas transgénicas y sus efectos sobre las relaciones G/S y las

cantidades totales de ligninas, para establecer la importancia real de las peroxidasas S en la biosíntesis de ligninas de tipo S y las limitaciones que estas imponen para la evolución de las ligninas.

V. Análisis de los resultados desde el punto de vista filogenético

Zinnia elegans es una planta anual con flores que pertenece a la familia de las Asteráceas. Esta especie es ampliamente usada como modelo en los estudios de lignificación (Fukuda 1996), en primer lugar, debido a la simplicidad y la dualidad del patrón de lignificación que muestran los tallos y los hipocotilos y, en segundo lugar, debido a la naturaleza del complemento isoenzimático de la peroxidasa, que se encuentra casi completamente restringido a la presencia de una isoenzima de naturaleza básica (Gabaldón y cols. 2005) (Figura 1.13).

El patrón de lignificación de *Z. elegans* es único en el sentido de que, en cierto estado del desarrollo, ofrece simultáneamente dos modelos de lignificación que se asemejan a lo que ocurre en las gimnospermas y las angiospermas. Así, en plantas de 25/30 días, las ligninas del hipocotilo están principalmente compuestas de unidades guaiacilo/siringilo en una relación 42/58 (G/S), mientras que las ligninas del tallo contienen importantes cantidades de unidades *p*-hidroxifenilo, en una relación 22/56/22 (H/G/S) (Ros Barceló y cols. 2004). Así, las unidades S predominan en el hipocotilo, mientras que las unidades G lo hacen en el tallo. En este aspecto, las ligninas del hipocotilo de *Z. elegans* son típicas de angiospermas, mientras que las ligninas del tallo se asemejan parcialmente a las gimnospermas, ya que el contenido H+G constituye el 78% de las unidades estructurales. Esta observación contrasta con el hecho de que en las raíces, los hipocotilos, los tallos y los cultivos celulares de *Z. elegans* se expresa la misma isoenzima de peroxidasa (López-Serrano y cols. 2004, Gabaldón y cols. 2005). Esta isoenzima de peroxidasa puede aislarse del medio de los cultivos celulares de *Z. elegans*, donde constituye aproximadamente el 40% del total de proteína secretada (Gabaldón y cols. 2005), una observación que sugiere que esta proteína se produce en grandes cantidades en este sistema modelo.

La isoenzima de peroxidasa de *Z. elegans* es capaz de oxidar no solo los tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos, sino también los tres aldehídos y los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos (Ros Barceló y cols. 2004, Gabaldón y cols. 2005), un hecho que sugiere que la isoenzima de peroxidasa usada por *Z. elegans* para sintetizar las ligninas S es la misma que la utilizada para sintetizar las ligninas G. Dadas estas extraordinarias propiedades catalíticas, cabría esperar que esta isoenzima de peroxidasa esté fuertemente conservada a lo largo de la evolución, como ocurre con las ligninas.

Desde una perspectiva evolutiva, las ligninas están uniformemente distribuidas desde las pteridófitas y las gimnospermas primitivas hasta las plantas más evolucionadas, las monocotiledóneas (Boerjan y cols. 2003). Salvo raras excepciones, la ruta de los monolignoles que produce ligninas en pteridofitas y gimnospermas sólo utiliza los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, mientras que en angiospermas y

gnetales la ruta biosintética de las ligninas también utiliza el alcohol sinapílico como sustrato. Esta dualidad no es siempre cierta, ya que los lycopodios como *Selaginella* sp, situados en el orden más basal dentro de las traqueófitas (Qiu y Palmer 1999), son capaces de sintetizar ligninas de tipo S, y éste también podría ser el caso de *Ceratopteris*, un helecho acuático, el cual comparte con las angiospermas, las gnetales y los lycopodios (*Selaginella* sp.), la presencia de vasos que coexisten con traqueidas (Carlquist y Schneider 2000). Así, en el caso de los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, la ruta biosintética de las ligninas se encuentra conservada a lo largo de la evolución de las plantas vasculares y, solo en los grupos más recientes, angiospermas y gnetales, y en los órdenes más basales dentro de las traqueófitas, el alcohol sinapílico entra a formar parte de los bloques de lignina. Este patrón de lignificación aparece como una característica adaptativa durante la evolución vegetal, ya que tanto las gimnospermas como las angiospermas comparten un conjunto de enzimas muy conservado, regulado por factores de transcripción, que son responsables de la formación de ligninas de tipo G (Peter y Neale 2004). Sin embargo, en las angiospermas y las gnetales han evolucionado dos enzimas: la sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD) y la sinapil aldehído 5 hidroxilasa-O-metil transferasa (AldOMT) que participan en la producción de las ligninas de tipo S y, dada la presencia de ligninas de tipo S en los lycopodios, es probable que la ruta de biosíntesis del alcohol sinapílico haya evolucionado (independientemente o no) al menos tres veces durante la evolución de las traqueófitas. Una hipótesis alternativa sería que el alcohol sinapílico se hubiese incorporado a las ligninas en las traqueófitas más primitivas, y el mecanismo de permanencia del alcohol sinapílico se haya perdido secundariamente en gimnospermas y helechos. Así la permanencia del alcohol sinapílico en las ligninas se correspondería con el estado primitivo.

Para estudiar si la adquisición de esta nueva ruta para la síntesis del alcohol sinapílico precede o sucede a la ganancia de la enzima responsable de la incorporación del alcohol sinapílico en las ligninas, la presencia de isoenzimas homólogos a la siringil-peroxidasa de *Zinnia elegans* se estudió en un conjunto de plantas terrestres, en el cual también se caracterizaron sus ligninas.

Algunas plantas basales contienen peroxidadas capaces de oxidar grupos siringilo, e isoenzimas de peroxidasa homólogas, con respecto al punto isoelectrico, a la isoenzima básica de *Z. elegans*, independientemente de que la naturaleza de sus ligninas sea de tipo G o de tipo G/S. Esta conservación también ocurre con el patrón de lignificación.

Gomez-Ros y cols. (2007a) sugiere que los determinantes estructurales de las siringil-peroxidadas están muy conservados durante la evolución de las plantas vasculares. De hecho, ciertas secuencias de aminoácidos y ciertas estructuras secundarias en lámina- β de las siringil-peroxidadas están presentes en las peroxidadas de gimnospermas que presentan solo ligninas de tipo S.

La ganancia evolutiva de la rama de biosíntesis de los monolignoles que conduce al alcohol sinapílico, y a las ligninas de tipo S, fue posible porque las enzimas responsables de su polimerización evolucionaron más temprano durante el desarrollo

de las plantas terrestres. Las peroxidases ya se encontraban presentes en especies vegetales ancestrales, previas a la radiación de las traqueófitas, como queda confirmado por la presencia de ciertos determinantes estructurales en las peroxidases de *Physcomitrella patens* (briófita) y *Marchantia polymorpha* (hepatofita) (Gómez-Ros y cols. 2007a). Los estudios filogenéticos apoyan el papel de estas peroxidases como vías altamente conservadas para la polimerización de los monómeros de las ligninas (Ros Barceló y cols. 2004). El gen que codifica las siringil-peroxidases evolucionó antes de la radiación de las traqueófitas y, como tal, debe considerarse como un gen ancestral dentro del origen monofilético de las plantas con flores, afirmación que está de acuerdo con el hecho de que las gimnospermas muestran un 70% de homología genética con las angiospermas (Ujino-Ihara y cols. 2005) y, en el caso de familias multigénicas, tales como la de la peroxidasa (Passardi y cols. 2004, Valerio y cols. 2004), es probable que esta multiplicidad haya surgido antes de la divergencia de las plantas con semillas (Nishiyama y cols. 2003).

Estudios filogenéticos sobre las siringil-peroxidases (Gomez-Ros y cols. 2007b) han mostrado que los genes que codifican estas enzimas podrían datar de antes de la aparición de las plantas vasculares e, incluso, podrían ser contemporáneos con la adquisición de los sistemas más primitivos de transporte de agua a corta distancia que coevolucionaron con las briófitas y las hepáticas (Ligrone y cols. 2000, Sperry 2003). Esta observación concuerda con el hecho de que en los briófitos ya se presenta una ruta ancestral fenilpropanoide que deriva hacia la formación de ácidos *p*-hidroxicinámicos, que finalmente son depositados en la pared celular (Rudolph y Samland 1985, Wächter y cols. 1987).

Debido a que la principal característica de las siringil-peroxidases es la ausencia de restricciones estéricas en el centro de unión al sustrato durante la oxidación de metabolitos *p*-hidroxifenilpropanoides (Ros Barceló y cols. 2004), esta observación completa el esquema de un modelo básico ancestral de arquitectura y función de la pared celular que evolucionó antes de la divergencia evolutiva de los briófitos, los helechos y las plantas con semilla (Ligrone y cols. 2002, Popper y Fry 2004), el cual ha sido finamente modelado en respuesta a presiones evolutivas específicas. En este escenario, las guaiacil-peroxidases constituirían el “estado evolucionado”. En tal escenario, estos resultados apoyan la hipótesis de una independencia evolutiva inicial de la lignificación y de la morfología de las células conductoras de agua, como es sugerido del análisis microquímico de los fósiles del Devónico inferior (Friedman y Cook 2000, Boyce y cols. 2003), que aportan evidencia de que la lignificación podría haberse originado en los tejidos periféricos de las protraqueófitas, siendo adquirida después para otorgar rigidez a las traqueidas en las eutraqueófitas. El hecho, de que las ligninas de tipo S están localizadas principalmente en las células vivas (fibras) de paredes gruesas del xilema, no implicadas en el transporte de agua, puede representar una herencia de su origen en las células vivas de paredes gruesas de un linaje ancestral de las plantas terrestres. Estas células vivas de paredes gruesas podrían haber sido similares en estructura y función a las esteréidas que actualmente conocemos en los musgos y en los briófitos.

El desarrollo de las nuevas herramientas genómicas, proteómicas y analíticas han permitido un estudio más preciso y exhaustivo de las características químicas y estructurales de las paredes vegetales, lo que supone una fuente de nuevos conocimientos que requerirán replantear las clasificaciones filogenéticas actuales. Recientemente, Sorensen y cols. (2008), estudiaron la composición de azúcares de las paredes celulares de una gran cantidad de especies vegetales. Este trabajo les permitió confirmar la presencia de (1→3), (1→4)-β-D-glucanos en las paredes de *Equisetum arvense*, este tipo de azúcares se consideraban hasta ahora exclusivos del orden Poales, grupo filogenéticamente muy distante de los esfenófitos.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral están de acuerdo con el hecho de que las peroxidasas vegetales de clase III se encuentran en la mayoría de las plantas vasculares, incluyendo los linajes de plantas terrestres más ancestrales, como los helechos, los musgos y las hepáticas (Duroux y Welinder 2003). Los relojes moleculares sugieren que las plantas terrestres son monofiléticas, y que divergieron de las algas verdes hace unos 700 millones de años, siendo las carófitas el linaje más cercano a las plantas terrestres (Qiu y Palmer 1999). Los estudios filogenéticos también sugieren que las peroxidasas vegetales de clase III aparecieron con la emergencia de las plantas terrestres (Duroux y Welinder 2003), y es probable que la ganancia de esta clase de enzimas confiriera importantes características adaptativas a las plantas para su nueva vida en la tierra, siendo la característica mas importante la adquisición de tejidos vasculares impregnados de ligninas. Por ello, cabe esperar que las enzimas responsables de la síntesis de las ligninas aparecieran muy temprano en la evolución de las plantas terrestres, y que estas enzimas, como ocurre con todas las proteínas que se expresan en grandes cantidades (Drummond y cols. 2005), hayan sido muy conservadas durante la evolución vegetal.

CONCLUSIONES

- 1) Los patrones de distribución histoquímica de la peroxidasa coinciden, en *Isoetes fluitans*, *Isoetes hystrix*, *Selaginella martensii*, *Equisetum telmateia*, *Phyllitis scolopendrium* y *Pteridium aquilinum*, con los patrones de distribución de las ligninas y confirman la evolución y diversificación de las estelas, desde los iniciales haces vasculares centrales de las primeras protostelas de licófitos, a las más complejas y evolucionadas eustelas y dictiostelas de esfenófitos y filicófitos.
- 2) Todas las especies estudiadas - a excepción de las algas *Mastocarpus stellatus*, que no presenta actividad peroxidasa, y *Ulva rigida* que solo oxida el alcohol sinápico y la siringaldazina - presentan actividad enzimática frente a los sustratos de la lignificación, fundamentalmente con el alcohol coniferílico y con el coniferilaldehído. Por el contrario, *Marchantia polymorpha*, *Isoetes hystrix*, *Ceratopteris thalictroides* y *Phyllitis scolopendrium* no tienen la capacidad de oxidar al alcohol sinápico y *Ceratopteris cornuta*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis* y *Pteridium aquilinum* no oxidan el sinapilaldehído. La capacidad de oxidar monolignoles aparece en todos los grupos vegetales, incluidas las algas. La capacidad para oxidar grupos siringilo aparece ya en plantas basales como el musgo *Physcomitrella patens*.
- 3) El patrón isoenzimático de peroxidasas desveló que solo *Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens*, *Isoetes hystrix*, *Selaginella martensii*, presentan isoenzimas básicas homólogas a la de *Zinnia elegans* necesariamente implicada en la lignificación. Las isoformas básicas son mucho menos numerosas que las ácidas. La presencia de homólogos de la isoenzima básica de *Zinnia elegans* no se mostró como indispensable para la lignificación. Así especies que no disponen de estos homólogos lignifican (*Isoetes fluitans*, *Equisetum telmateia*, *Ceratopteris thalictroides*, *Ceratopteris cornuta*, *Phyllitis scolopendrium*, *Dryopteris affinis*, *Pteridium aquilinum* y *Posidonia oceanica*) y, por el contrario, especies que sí los poseen no lignifican (*Physcomitrella patens*).
- 4) En todas las especies estudiadas, excepto las algas y el musgo *Physcomitrella patens*, aparecieron productos de degradación de las paredes celulares que implican la presencia de ligninas en las mismas, incluso en la hepática *Marchantia polymorpha*. Los residuos más abundantes son los que proceden del alcohol coniferílico y del coniferilaldehído, siendo menos abundante - aunque apareciendo en todos los grupos vegetales estudiados - el alcohol sinápico. Esto evidencia que entre las hepáticas y los licófitos hay especies capaces de oxidar alcohol sinápico para incorporarlo a sus ligninas.
- 5) Las ligninas encontradas en las especies estudiadas contienen mayoritariamente unidades G, en menor proporción unidades H y, con menor frecuencia, unidades S. Estas últimas, que son consideradas típicas de angiospermas, aparecen

también en *Marchantia polymorpha*, *Isoetes hystrix* y *Ceratopteris cornuta*, lo que implica que la capacidad de sintetizar unidades S, existe en plantas pertenecientes a grupos filogenéticos ancestrales. Esto podría ser interpretado en el sentido de que la maquinaria genética que participa en los procesos de síntesis de ligninas está presente en todos los grupos vegetales terrestres, desde los más ancestrales hasta los más evolucionados, aunque su expresión parece estar fuertemente regulada.

- 6) La única angiosperma estudiada, la monocotiledónea marina *Posidonia oceanica*, presenta el tipo de ligninas propio de las plantas más evolucionadas. Esto puede ser interpretado en el sentido de que ha conservado la maquinaria genética necesaria para la síntesis de ligninas, a pesar del despilfarro energético que esto significa, o que esa maquinaria es común a todos los organismos vegetales, la evolución se ha producido sin abandonar el medio marino y con fines diferentes de los de conducción y soporte.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeles FB y Biles CL.** 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* 95: 269-273.
- Adler A.** 1977. Lignin chemistry past, present and future. *Wood Sci Technol* 11: 169-218.
- Alba CM, de Forchetti SM y Tigier HA.** 1996. Peroxidase and phenoloxidase activities in peach endocarp. En "Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology"(Obinger C, Burner U, Ebermann R, Pennel C, Greppin H, eds) pp 243-246, University of Geneva, Geneva.
- Aloni R.** 1987. Differentiation of vascular tissues. *Annu Rev Plant Physiol* 38: 179-204.
- Aloni R, Feigenbaum P, Kalev N y Rozovsky S.** 2000. Hormonal control of vascular differentiation in plants: the physiological basis of cambium ontogeny and xylem evolution. In *Cell and molecular biology of wood formation*. BIOS Scientific, Oxford 223-236.
- Amer GI y Drew SW.** 1980. Microbiology of lignin degradation. In Tsao GT, Flickinger MC y Finn RK, eds. *Annual reports on fermentation processes*. Academic Press. Inc, New York, 67-103.
- Amthor JS.** 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Ann Bot* 91: 673-695.
- Anterola A, van Rensburg H, van Heerden PS, Davin LB y Lewis NG.** 1999. Multi-site modulation of flux during monolignol formation in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261: 652-657.
- Anterola A y Lewis NG.** 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294.
- Aoyama W, Sasaki S, Matsumura S, Mitsunaga T, Hirai H, Tsutsumi Y y Nishida T.** 2002. Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyses the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. *J Wood Sci*: 497-504.
- Assigbetse K, Cuny G, Valette C, Delannoy E, Bresson E, Jalloul A, Daniel JF, Geiger JP y Nicole M.** 1999. Cloning and characterization of a bacterial-induced peroxidase-encoding cDNA from cotton. *Plant Physiol* 121: 312.
- Arezki O, Boxus P, Kevers C y Gaspar T.** 2001. Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. *Plant Growth Regul* 33: 215-219.
- Baas P y Wheeler EA.** 1996. Parallelism and reversibility in xylem evolution: a review. *IAWA (Int Assoc Wood Anat) J* 17: 351-364.
- Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C y Rolando C.** 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32: 789-793.

Bakalovic N, Passardi F, Ioannidis V, Cosio C, Penel C, Falquet L y Dunand C. 2006. PeroxiBase: a class III plant peroxidase database. *Phytochemistry* 67: 534-539.

Bakardjieva NT, Christova N y Christov K. 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitive of peroxidase from mosses (*Mnium sp.*) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature. *Can J Bot* 74: 1665-1670.

Banci L. 1997. Structural properties of peroxidase. *J Biotechnol* 53: 253-263.

Bárbara I, Cremades J, Calvo S, López-Rodríguez MC y Dosil J. 2005. Checklist of the benthic marine and brackish Galician algae (NW Spain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62: 69-100.

Barber KR, Rodríguez Marañón MJ, Shaw GS y van Huystee RB. 1995. Structural influence of calcium on the heme cavity of the cationic peanut peroxidase as determined by ^1H -NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 232: 825-833.

Bartonek-Roxa E, Eriksson H y Mattiasson B. 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1088: 245-250.

Baydoun EA y Brett CT. 1985. Comparison of cell wall compositions of the rhizomes of three seagrasses. *Aquat Bot* 23: 191-196.

Beck CB, Coy K y Schmidt R. 1982. Observations on the fine structure of *Callixylon* wood. *Am J Bot* 69: 54-76.

Bell-Lelong DA, Cusumano JC, Meyer K y Chapple C. 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*: regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol* 113: 729-738.

Benito B y Rodríguez-Navarro A. 2003. Molecular cloning and characterization of a Sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 36: 382-389.

Benner R, Newell SY, Maccubbin AE y Hodson RE. 1984. Relative contributions of bacteria and fungi to rates of degradation of lignocellulosic detritus in salt-marsh sediments. *Appl Environ Microbiol* 48: 36-40.

Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A y Plourde GL. 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* 121: 135-145.

Bhattacharya D y Medlin L. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol* 116: 9-15.

Billa E, Tollier MT y Monties B. 1996. Characterization of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: effect of temperature and reaction time. *J Sci Food Agric* 72: 250-256.

Blee KA, Choi JW, O'Connell AP, Schuch W, Lewis NG y Bolwell GP. 2003. A lignin specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry* 64: 163–176.

Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR y Bolwell P. 2001b. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol Biol* 47: 607-620.

Blee KA, Wheatley ER, Bonham VA, Mitchell GP, Robertson D, Slabas AR, Burrell MM, Wojtaszek P y Bolwell GP. 2001a. Proteomics analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta* 212: 404-415.

Boerjan W, Ralph J y Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.

Bohm BA y Tyron RM. 1967. Phenolic compounds in ferns. A survey of some ferns for cinnamic and benzoic acid derivatives. *Canadian Journal of Botany* 45: 585-593.

Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Januneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré-Tugayé MT, Boudet A y Pont-Lezica R. 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24: 3421-3432.

Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA y Lamb C. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12: 2383-2394.

Botella MA, Quesada MA, Hasegawa PM y Valpuesta V. 1993. Nucleotide sequences of two peroxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol* 103: 665-666.

Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT y Pont-Lezica R. 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.

Boudet AM, Lapierre C y Grima-Pettenati J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the lignification. *New Phytol* 129: 203-236.

Boudet AM. 1998. A new view of lignification. *Trends Plant Sci* 3: 67-71.

Boyce CK, Cody GD, Fogel ML, Hazen RM, Alexander CMOD y Knoll AH. 2003. Chemical evidence for cell wall lignification and the evolution of tracheids in early devonian plants. *Int J Plant Sci* 164:691-702.

Boyce CK, Zwieniecki MA, Cody GD, Jacobsen C, Wirick S, Knoll AH y Holbrook NM. 2004. Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. *PNAS* 50: 17555-17558.

Brady JD , Sadler IH y Fry SC. 1996. Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *J Biochem* 315: 323-327.

Brett C y Waldron K. 1990. Physiology and biochemistry of plant cell walls. Unwin Hyman. London.

Brodribb TJ, Holbrook NM y Hill RS. 2005. Seedling growth in conifers and angiosperms: impacts of contrasting xylem structure. *Aust J Bot* 53: 749-755.

Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R y Turner SR. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17: 2281-2295.

Buchanan BB, Gruissem W y Jones RL. 2000. Biochemistry & Molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Monona Drive, Rockville USA.

Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R y Ros Barceló A. 1993. Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Hort Sci* 28: 38-40.

Capellades M, Torres MA, Bastisch I, Stiefel V, Vignols F, Bruce WB, Peterson D, Puigdoménech P y Rigau J. 1996. The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissues. *Plant Mol Biol* 31: 307-322.

Carafa A, Duckett JG, Knox JP y Ligrone R. 2005. Distribution of cell-wall xylans in bryophytes and tracheophytes: new insights into basal interrelationships of land plants. *New Phytologist* 168: 231-240.

Carlquist S y Schneider EL. 2000. SEM studies of vessels in ferns. 16. Pacific tree ferns (Blechnaceae, Cyatheaceae, Dicksoniaceae). *Pacific Science* 54: 75-86.

Carlquist S y Schneider EL. 2001. Vessels in ferns: structural, ecological, and evolutionary significance. *American Journal of Botany* 88: 1-13.

Carpin S, Crèvecoeur M, Greppin H y Penel C. 1999. Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol* 120: 799-810.

Carpin S, Crèvecoeur M, de Meyer M, Simon P, Greppin H y Penel C. 2001. Identification of a Ca^{2+} -pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell* 13: 511-520.

Carpita NC y Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3: 1-30.

Carpita NC. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.

Cassab GI y Varner JE. 1988. Cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol* 39: 321-353.

Chabannes M, Ruel K, Chabbert B, Jauneau A, Joseleau JP y Boudet AM. 2001. In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a

differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J* 28: 271-282.

Chapple CCS, Vogt T, Ellis BE y Somerville CR. 1992. An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4: 1413-1424.

Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R y Canut H. 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* 66: 453-461.

Chasan R. 1994. Tracing tracheary element development. *Plant Cell* 6:917-919.

Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T y Luan S. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 661-677.

Chibbar RN, Cella R y van Huystee RB. 1984. The heme moiety in peroxidase. *Can J Biochem Cell Biol* 62: 1046-1050.

Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV y Boerjan W. 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135.

Christensen JH, Overney S, Rohde A, Diaz WA, Bauw G, Simon P, Van Montagu M y Boerjan W. 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol Biol* 47: 581-593.

Christiernin M. 2006. Composition of lignin in outer cell-wall layers. Tesis doctoral.

Church DL y Galston AV. 1988. 4-coumarate:coenzyme-A ligase and isoperoxidase expresion in *Zinnia mesophyll* cells induced to differentiate into tracheary elements. *Plant Physiol* 88: 679-684.

Collen J, Ekdhal A, Abrahamsson K y Pedersen M. 1994. The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry* 36: 1197-1202.

Collinge M y Boller T. 2001. Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* 46: 521-529.

Converso DA y Fernández ME. 1996. Ca²⁺ activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. *Arch Biochem Biophys* 333: 59-65.

Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H y Penel C. 1997. Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochem* 99: 177-186.

Czaninski Y y Catesson AM. 1969. Localisation ultrastructurale d'activites peroxydasiques dans les tissus conducteurs vegetaux au cours du cycle annuel. *J Microscopie* 8: 875-888.

Dean JFD y Eriksson KEL. 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48: 21-33.

Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, Nagata-Hiwatashi M, Nakamura K, Okamura Y, Sassa N, Suzuki S, Yazaki J, Kikuchi S y Fukuda H. 2002. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15794-15799.

Delwiche CF, Grahan LE y Thomson N. 1989. Lignin-like compounds and sporopollenin in *Coleochaete*, an algal model for land plant ancestry. *Science* 245: 399-401.

Devan M, Shufflebottom D, Edwards K, Jefferson R y Schuxh W. 1989. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *EMBO J* 8: 1899-1906.

Donaldson LA. 1985. Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. *NZJ For Sci* 15: 349-360.

Donaldson LA. 2001. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57: 859-873.

Douglas CJ, Hauffe KD, Ites-Morales ME, Ellard M, Paszkowski U, Hahlbrock K y Dangi JL. 1991. Exonic sequences are required for elicitor and light activation of a plant defense gene, but promoter sequences are sufficient for tissue specific expression. *EMBO J* 10: 1767-1775.

Douglas CJ. 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trens Plant Sci* 1: 171-178.

Dovgan IV y Medvedeva EI. 1983a. Change in the structural elements of the lignin of the brown alga *Cystoseira barbata* at different ages. *Chem Nat Compd* 19 (I): 81-84.

Dovgan IV, Medvedeva EI y Yanishevskaya EN. 1983b. Cleavage of the lignins of the alga *Cystoseira barbata* by thioacetic acid. *Chem Nat Compd* 19 (I): 84-87.

Dowd PW y Norton RA. 1995. Browning-associated mechanism of resistance to insects in corn callus tissues. *J Chem Ecol* 21: 583-600.

Doyle JA. 1998. Phylogeny of vascular plants. *Ann Rev Eco System* 29: 567-599.

Drummond DA, Bloom JD, Adami C, Wilke CO y Arnold FH. 2005. Why highly expressed proteins evolve slowly. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14338-14343.

Duarte-Vázquez MA, García-Almendárez BE, Rojo-Domínguez A, Whitaker JR, Arroyave-Hernández C y Regalado C. 2003. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isoenzyme. *Phytochemistry* 62: 5-11.

- Durbbeej B y Eriksson LA.** 2003. Formation of β -O-4 lignin models – a theoretical study. *Holzforschung* 57: 466-478.
- Duroux L y Welinder KG.** 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J Mol Evol* 57: 397-407.
- Edwards D.** 1993. Cells and tissues in the vegetative sporophytes of early land plants. *New Phytol* 125: 225-247.
- Erickson M y Miksche GE.** 1974. On the occurrence of lignin or polyphenols in some mosses and liverworts. *Phytochemistry* 13: 2295-2299.
- Farmer VC.** 1953. The lignin of *Sphagnum*. *Research* 6: A1-A3.
- Feild TS, Brodribb T y Holbrook NM.** 2002. Hardly a relict: reezing an the evolution of vesselless wood in Winteraceae. *Evolution* 56: 464-478.
- Ferrer MA y Ros Barceló A.** 1994b. Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalyzed oxidation of coniferyl alcohol. *J Plant Physiol* 144: 64-67.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1990. Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. A model for the lignification of plant cell walls in the absence of H₂O₂. *FEBS Lett* 276: 127-130.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Ros Barceló A y Muñoz R.** 1992. The cell wall localization of two strongly basic isoperoxidases in etiolated *Lupinus albus* hypocotyls and its significance in coniferyl alcohol oxidation and indole-3-acetic acid catabolism. *J Plant Physiol* 139: 611–616.
- Fossdal CG, Sharma P y Lonneborg A.** 2001. Isolation of the first putative peroxidase cDNA from a conifer and the local and systemic accumulation of related proteins upon pathogen infection. *Plant Mol Biol* 47: 423-435.
- Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM y Chapple C.** 2002. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusaul lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 30: 47-59.
- Franke R, McMichael CM, Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC y Chapple C.** 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J* 22: 223-234.
- Freudenberg K, Hen CL, Harkin JM, Nimz H y Renner H.** 1965. Observations on lignin. *Chem Commun*: 224-225.
- Friedman WE y Cook ME.** 2000. The origin and early evolution of tracheids in vascular plants: integration of palaeobotanical and neobotanical data. *Phil. Trans R Soc Lond* 355: 857-868.
- Fry SC.** 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 497-520.
- Fujiyama K, Takemura H, Shinmyo A, Okada H y Takano M.** 1990. Genomic DNA structure of two new horseradish-peroxidase-encoding genes. *Gene* 89: 163-169.

Fukuda H y Komamine A. 1980. Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65: 57-60.

Fukuda H y Komamine A. 1982. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta* 155: 423-430.

Fukuda H. 1992. Tracheary element formation as a model of cell differentiation. *Int Rev Cytol* 136: 289-332.

Fukuda H. 1996. Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 299-325.

Fukuda H. 2004. Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5:379-391.

Fukuda H. 1994. Redifferentiation of single mesophyll cells into tracheary elements. *Int J Plant Sci* 155:262-271.

Fukuda H. 1997. Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9:1147-1156.

Fukuda H, Watanabe Y, Kuriyama H, Aoyagi S, Sugiyama M, Yamamoto R, Demura T y Minami A. 1998. Programming of cell death during xylogenesis. *J Plant Res* 111:253-256.

Fukuda H y Komamine A. 1985. Cytodifferentiation. En "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (Vasil IK, ed) 2:149-212, New York, Academic Press.

Fukushima K y Terashima N. 1991. Heterogeneity in formation of lignin XIV. Formation and structure of lignin in differentiation xylem of *Ginkgo biloba*. *Holzforschung* 45: 87-94.

Gabaldón C, López -Serrano LV, López Núñez-Flores MJ, Esteban-Carrasco A y Ros Barceló A. 2005. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol* 139: 1138-1154.

Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Merino F, Cuello J, Pedreño MA y Ros Barceló A. 2006. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS Lett.* 580:4311-4316.

Geiger H y Fuggerer H. 1979. Über den chemismus der Weisner-reaktion auf Lignin. *Z. Naturforsch* 34: 1471-1472.

Gensel PG. 1979. Two *Psilophyton* species from the Lower Devonian of eastern Canada With a discussion on morphological variation within the genus. *Palaeontographica* 168: 81-99.

Godshalk GL y Wetzel RG. 1978. Decomposition of aquatic angiosperms. III. *Zostera marina* L. and a conceptual model of decomposition. *Aquat Bot* 5: 329-354.

Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N y Grima-Pettenati J.

2005. *EgMYB2*, a new trnascriptional activator form *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and llinin biosynthesis. *Plant J* 43: 553-567.

Goldberg R, Liberman M, Mathieu C, Pierron M y Catesson AM. 1987. Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: possible involvement in the cell wall stiffening process. *J Exp Bot* 38: 1378-1390.

Gómez-Ros LV. 2007. Filogenia de una peroxidasa de la síntesis de ligninas en plantas vasculares terrestres. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.

Gómez-Ros LV, Aznar-Asensio G, Hernández JA, Bernal MA, Núñez-Flores MJL, Cuello J y Ros Barceló A. 2007b. Structural motifs of syringyl peroxidases are conserved during angiosperm evolution. *J Agric Food Chem* 55:4131-4138.

Gómez-Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA y Ros Barceló A. 2007a. Structural motifs of syringyl peroxidases pre-date not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytol* 173: 63-78.

Gómez-Ros LV, Paradiso A, Gabaldón C, Pedreño MA, de Gara L y Ros Barceló A. 2006. Two distinct cell sources of H₂O₂ in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system. *Protoplasma* 227: 175-183.

Grabber JH, Hatfield RD y Ralph J. 2003. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. *J Agric Food Chem* 51: 4984-4989.

Grabber JH, Ralph J y Hatfield RD. 1998. Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde. *J Sci Food Agric* 78: 81-87.

Gray JSS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP y Montgomery R. 1996. The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology* 6: 23-32.

Green BN y Oliver RWA. 1991. The study of intact proteins and glycoproteins by electrospray m.s. *Biochem Soc Trans* 19: 929-935.

Greppin H, Penel C y Gaspar T. 1986. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva. Switzerland.

Gross GG. 1980. The biochemistry of lignification. *Adv Bot Res* 8: 25-63.

Grotewold E, Drummond BJ, Bowen B y Peterson T. 1994. The myb-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76: 543-553.

Groover A, DeWitt N, Heidel A y Jones A. 1997. Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. *Protoplasma* 196: 197-211.

Groover A y Jones A. 1999. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol* 119: 375-384.

Hahlbrock K y Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 347-369.

Hapiot P, Pinson J, Neta P, Francesch C, Mhamdi F, Rolando C y Schneider S. 1994. Mechanism of oxidative coupling of coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 36: 1013-1020.

Hatfield RD y Vermerris W. 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol* 126: 1351-1357.

Hatfield RD, Grabber J, Ralph J y Brei K. 1999. Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes. *J Agric Food Chem* 47: 628-632.

Hauffe KD, Paszkowski U, Schulze-Lefert P, Hahlbrock K, Dangl JL y Douglas CJ. 1991. A parsley 4CL-1 promoter fragment specifies complex expression patterns in transgenic tobacco. *Plant Cell* 3: 435-443.

Hawkins SW y Boudet AM. 1996. Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunnii* Hook.): histochemistry of early changes in young plants. *Protoplasma* 191: 96-104.

Hazlewood GP y Gilbert HJ. 1998. Structure and function analysis of Pseudomonas plant cell wall hydrolases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 211-241.

Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E y Kieliszewski MJ. 2004. Di-isodityrosine is the intermolecular crosslink of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked in vitro. *J Biol Chem* 279: 55474-55482.

Hendriks T y van Loon LC. 1990. Petunia peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J Plant Physiol* 136: 519-525.

Heredia A, Jimenez A y Guillen R. 1995. Composition of plant cell walls. *Z Lebensm Unters Forsch* 200: 24-31.

Herrmann KM. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.

Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P y Sandberg G. 2001. A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14732-14737.

Higuchi T. 1985. Biosynthesis of lignin. En "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" (Higuchi T, ed) pp 141-160, New York, Academic Press.

Higuchi T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol* 24: 23-63.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y y Matsui H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*. 42:462-468.

Hirata T, Ashida Y, Mori H, Yoshinaga D y Goad LJ. 2000. A 37-kDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress. *Phytochemistry* 55: 197-202.

- Holm KB, Andreassen PH, Eckloff MG, Kristensen BK y Rasmussen SK.** 2003. Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. J Exp Bot 54: 2275-2284.
- Hosokawa M, Suzuki S, Umezawa T, Hibino T y Sato Y.** 2001. Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. Plant Cell Physiol 42: 959-968.
- Hoyle MC.** 1977. High resolution of peroxidase-indolacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. Plant Physiol 60: 787-793.
- Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR y Kwak SS.** 1997. Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. Mol Gen Genet 255: 382-391.
- Ibrahim RK, Towers GHN y Gibss RD.** 1962. Syringic and sinapic acids as indicators of differences between major groups of vascular plants. Botanical Journal of the Linnean Society 58: 223-230.
- Iiyama K y Wallis AF.** 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. Wood Sci Technol 22: 271-280.
- Iiyama K y Wallis AF.** 1990. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. Journal of the Science of Good and Agriculture 51: 145-161.
- Iori R, Cavalieri B y Palmieri S.** 1995. Cathodic peroxidases of durum wheat flour. Cereal Chem 72: 176-181.
- Ishida A, Ono K y Matsusaka T.** 1985. Cell wall-associated peroxidase in cultured cells of liverwort, *Marchantia polymorpha* L. Changes of peroxidase level and its localization in the cell wall. Plant Cell Reports 4: 54-57.
- Ito H, Tsugawa H, Matsui H, Honma M, Otsuki Y, Murakami T y Ohashi Y.** 2000. Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. Plant Sci 155: 85-100.
- Jamet E, Canut H, Boudart G y Pont-Lezica RF.** 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. Trends Plant Sci 11: 33-39.
- Jespersen HM, Kjaersgard IV, Østergaard L y Welinder KG.** 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. Biochem J 326: 305-310.
- Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrtens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B y Martin C.** 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. EMBO J 19: 6150-6161.
- Jin Z, Matsumoto Y, Tange T, Akiyama T, Higuchi M, Ishii T y Iiyama K.** 2005. Proof of the presence of guaiacyl-syringyl lignin in *Selaginella tamariscina*. J Wood Sci 51: 424-426.
- Jin Z, Shao S, Katsumata KS y Iiyama K.** 2007. Lignin characteristics of peculiar vascular plants. J Wood Sci 53: 520-523.

- Johnson DB, Moore WE y Zank LC.** 1961. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi* 44: 793-789.
- Jones L, Ennos AR y Turner SR.** 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutante of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 26: 205-216.
- Jones AM y Dangl JL.** 1996. Logjam at the Styx: programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci* 1:114-119.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF y Donoghue MJ.** 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer, Sunderland, Mass 576.
- Kärkönen A, Koutaniemi S, Mustonen M, Syrjänen K, Brunow G, Kilpeläinen I, Teeri TH y Simola LK.** 2002. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiol Plant* 114: 343-353.
- Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, Endo S, Yamada K y Ebinuma H.** 2000. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* 26: 289-301.
- Keller B.** 1994. Gene expression of plant extracellular proteins. En "Genetic Engineering" (Setlow JK ed) 16:255-270, New York, Plenum Press.
- Keller B y Baumgartner C.** 1991. Vascular-specific expression of the bean GRP 1.8 gene is negatively regulated. *Plant Cell* 3:1051-1061.
- Kenrick P y Crane PR.** 1991. Water-conducting cells in early fossil land plants: implications for the early evolution of tracheophytes. *Bot Gaz* 152: 335-356.
- Kenrick P y Crane PR.** 1997. The origin and early diversification of land plants. A cladistic study. Smithsonian Institution Press.
- Kim H, Ralph J, Lu L, Pilate P, Leplé JC, Pollet B y Lapierre CB.** 2002. Identification of the structure and origin of thioacidolysis marker compounds for cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in angiosperms. *J Biol Chem* 49: 47412-47419.
- Klap VA, Hemminga MA y Boon JJ.** 2000. Retention of lignin in seagrasses: angiosperms that returned to the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 194: 1-11.
- Knoll AH y Niklas KJ.** 1987. Adaptation, plant evolution, and the fossil record. *Rev Paleobot Palynol* 50: 127-149.
- Ko J-H, Han K-H, Park S y Yang J.** 2004. Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiol* 135: 1069-1083.
- Kobayashi H y Fukuda H.** 1994. Involvement of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells. *Planta* 194:388-394.
- Kobayashi T, Suzuki M, Taguchi H, Shigematsu M y Tanahashi M.** 2001. Analysis of the rate-determining factors in the oxidative reaction of monolignols by peroxidase-H₂O₂ system. *JCPE Journal* 13: 183-186.

Kobayashi T, Taguchi H, Shigematsu M y Tanahashi M. 2005. Substituent effects of 3,5-disubstituted *p*-coumaryl alcohols on their oxidation using horseradish peroxidase-H₂O₂ as the oxidant. *J Wood Sci* 51: 607-614.

Kohlenbach HW y Schmidt B. 1975. Cytodifferenzierung in form einer direkten umwandlung isolierter mesophyll-zellen zu tracheiden. *Z Pflanzenphysiol* 75:369-374.

Koutaniemi S, Toikka MM, Kärkönen A, Mustonen M, Lundell T, Simola LK, Kilpeläinen IA y Teeri TH. (2005) Characterization of basic *p*-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. *Plant Mol Biol* 58:141-157

Koutaniemi S, Warinowski T, Kärkönen A, Alatalo E, Fossdal CG, Saranpää P, Laadso T, Fagerstedt KV, Simola LK, Paulin L, Rudd S y Teeri TH. 2007. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Mol Biol* 65: 311-328.

Kozela C y Regan S. 2003. How plants make tubes. *Trends Plant Sci* 8: 159-164.

Kratzl K y Eibl J. 1951. Chemical and botanical evidence for lignification. *Mitt Oesterr Ges Holzforsch* 3: 76-77.

Kretschmann D. 2003. The remarkable deformability of wood in a moist environment resembles that of ductile metals. A combination of traditional mechanical tests and cutting-edge diffraction experiments reveal the molecular mechanism that determines such behaviour. *Nat Mat* 2: 775-776.

Kuo J y Cambridge ML. 1978. Morphology, antomy and histochemistry of the Australian seagrasses of the genus *Posidonia köning* (Posidoniaceae). II. Rhizome and root of *Posidonia australis* Hook F. *Aquat Bot* 5: 191-206.

Kuriyama H y Fukuda H. 2000. Regulation of tracheary element differentiation. *J Plant Growth Regul* 20:35-41.

Lacombe E, Van Doorselaere J, Boerjan W, Boudet AM y Grima-Pettenati J. 2000. Characterization of *cis*-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J* 23: 663-676.

Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M y Rothstein S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7542-7546.

Lagrimini LM. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol* 96: 577-583.

Larkum AWD y Den Hartog C. 1989. Evolution and biogeography of seagrasses. In *Biology seagrasses*. Larkum AWD, McComb AJ y Shepherd SA, Eds. *Aquatic plant Studies*. Elsevier. Amsterdam. 112-156.

Lai YZ y Sarkanen KV. 1975. Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. *Cellulose Chem Tech* 9: 239-245.

- Lambers H, Chapin FS y Pons TL.** 1998. Plant physiological ecology. Springer.
- Lancashire JR y Ennos AR.** 2002. Modelling the hydrodynamic resistance of bordered pits. *J Exp Bot* 53: 1485-1493.
- Lapierre CB, Pollet B y Rolando C.** 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res Chem Intermed* 21: 397-412.
- Larkum AWD, Roberts G, Kuo J y Strother S.** 1989. Gaseous movements in seagrasses. In: Larkum AWD, MCombs AJ, Shepherd SA, Eds. *Biology of seagrasses. Aquatic Plant Studies.* Elsevier. Amsterdam, 686-722.
- Lauvergeat V, Rech P, Jauneau A, Guez C, Coutos-Thevenot P y Grima-Pettenati J.** 2002. The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. *Plant Mol Biol* 50: 497-509.
- Levy A, Liang X, Pintor-Toro JA, Dixon RA y Lamb CJ.** 1992. *cis*-Element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* 4: 263-271.
- Lewis DH.** 1980. Boron, lignification and the origin of vascular plants - a unified hypothesis. *The New Phytologist* 84: 209-229.
- Lewis NG y Yamamoto E.** 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.
- Li H, Taylor EL y Taylor TN.** 1996. Permian vessel elements. *Science* 271: 188-189.
- Li L, Popko JL, Umezawa T y Chiang VL.** 2000. 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem* 275: 6537-6545.
- Li Y, Kajita S, Kawai S, Katayama Y y Morohoshi N.** 2003. Downregulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *J Plant Res* 116: 175-182.
- Ligrone R, Duckett JG y Renzaglia KS.** 2000. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Phil Trans R Soc Lond B, Biology Sciences* 355: 795-813.
- Ligrone R, Vaughn KC, Renzaglia KS, Knox JP y Duckett JG.** 2002. Diversity in the distribution of polysaccharide and glycoprotein epitopes in the cell walls of bryophytes: new evidence for multiple evolution of water-conducting cells. *New Phytologist* 156:491-508.
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL y Yanofsky MF.** 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
- Lindberg B y Theander O.** 1952. Studies on *Sphagnum* peat. Lignin in *Sphagnum*. *Acta Chemica Scandinavica* 6: 311-312.

Liu L, Dean JFD, Friedman WE y Eriksson KEL. 1994. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *Plant J* 6: 213-224.

Logan KJ y Thomas BA. 1985. Distribución of lignin derivatives in plants. *New phytol* 99: 571-585.

López-Serrano M, Fernández MD, Pomar F, Pedreño MA y Ros Barceló A. 2004. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J Exp Bot* 55: 423-431.

Lotsy, JP. 1909. Vorlesungen über Descendenztheorien mit besonderer Berücksichtigung der botanischen Seite der Frage. Jena, Alemania. Fischer

McCann MC, Domingo C, Stacey NJ, Milioni D y Roberts K. 2000. Tracheary element formation in an *in vitro* system. En "Cell and molecular biology of wood formation" (Savidge R, Barnett J, Napier R, eds) pp 457-470, Oxford, BIOS Scientific Publishers Ltd.

Manders WF. 1987. Solid state ^{13}C NMR determination of the syringyl/guaiacyl ratio in hardwoods. *Holzforschung* 41: 13-18.

Martin C y Paz-Ares J. 1997. MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* 13: 67-73.

Matern U, Grimmig B y Kneusel RE. 1995. Plant cell wall reinforcement in the disease-resistance response: molecular composition and regulation. *Can J Bot* 73: 511-517.

Matlok J, Krzakowa M, y Rudolph H. 1989. Peroxidase patterns in Bryophytes: a critical evaluation. *J Hattori Bot Lab* 67: 407-414.

Mauseth JD. 1988. Plant anatomy. Benjamin Cummings, Menlo Park, Calif. 794 pp.

McDougall GJ. 1992. Changes in the cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry* 31: 3385-3389.

McDougall GJ. 2001. Cell-wall-associated peroxidases from the lignifying xylem of angiosperms and gymnosperms: monolignol oxidation. *Holzforschung* 55: 246-249.

McEldoon JP y Dordick JS. 1996. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol Prog* 12: 555-558.

McMannus MT y Ashford DA. 1997. Glycosylation of plant peroxidases. *Plant Perox Newslett* 10: 15-23.

Miksche GE y Yasuda S. 1978. Lignin of "giant" mosses and some related species. *Phytochemistry* 17: 503-504.

Milioni D, Sado PE, Stacey NJ, Roberts K y McCann MC. 2002. Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element is revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis. *Plant Cell* 14: 2813-2824.

Minami A, Fukuda H. 1995. Transient and specific expression of a cysteine endopeptidase during autolysis in differentiating tracheary elements from *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 36:1599-1606.

Minic Z y Jouanin L. 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* 44: 435-449.

Mishler BD y Churchill SP. 1984. A cladistic approach to the phylogeny of the "bryophytes". *Brittonia* 36: 406-424.

Mo L, Egertsdotter U y Von A. 1996. Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Ann Bot* 77: 143-152.

Mohan R, Bajar AM y Kolattukudy PE. 1993. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (tap 1) by wounding in transgenic tobacco and activation of tap1/GUS and tap2/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol Biol* 12: 341-354.

Motose H, Fukuda H y Sugiyama M. 2001. Involvement of local intercellular communication in the differentiation of zinnia mesophyll cells into tracheary elements. *Planta* 213: 121-131.

Neish AC. 1968. Monomeric intermediates in the biosynthesis of lignin. En "Constitution and Biosynthesis of Lignin" (Freudenberg K, Neish AC, eds) pp 3-43, New York, Springer-Verlag.

Neustaedter DA, Lee SP y Douglas CJ. 1999. A novel parsley *4CL1* cis-element is required for developmentally regulated expression and protein-DNA complex formation. *Plant J* 18: 77-88.

Newman LJ, Perazza DE, Juda L y Campbell MM. 2004. Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-pigment morphogenic components of the *det3* mutant phenotype. *Plant J* 37: 239-250.

Nickrent DL, Parkinson CL, Palmer JD y Duff RJ. 2000. Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1885-1895.

Nielsen KL, Indiani C, Henriksen A, Feis A, Becucci M, Gajhede M, Smulevich G y Welinder KG. 2001. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochemistry* 40: 11013-11021.

Niklas KJ. 1984. Size-related changes in the primary xylem anatomy of some early tracheophytes. *paleobiology* 10: 487-506.

Niklas KJ. 1985. The evolution of tracheid diameter in early vascular plants and its implications on the hydraulic conductance of the primary xylem strand. *Evolution* 39: 1110-1122.

Niklas KJ. 1990. Biomechanics of *Psilotum nudum* and some early Paleozoic vascular sporophytes. *Am J Bot* 77: 590-606.

Niklas KJ. 1992. Plant biomechanics. University of Chicago Press. Chicago. 607 pp.

Niklas KJ. 1994. The allometry of safety factors for plant height. *Am J Bot* 81: 345-351.

Niklas KJ. 1997. The Evolutionary Biology of Plants. University of Chicago Press.

Nishiyama T, Fujita T, Shin T, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, Kohara Y y Hasebe M. 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8007-8012.

Northcote DH. 1995. Aspects of vascular tissue differentiation in plants: parameters that may be used to monitor the process. *Int J Plant Sci* 156: 145-156.

Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL y Lewis NG. 1995. Towards the specification of consecutive steps in macro-molecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39: 71-79.

Nothnagel AL y Nothnagel EA. 2007. Primary cell wall structure in the evolution of land plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 1271-1278.

Novo Uzal E. 2008. Lignificación en cultivos celulares de gimnospermas basales. Tesis doctoral. Universidad de A Coruña.

O'Malley DM, Whetten R, Bao W, Chen CL y Sederoff RR. 1993. The role of laccase in lignification. *Plant J* 4: 751-757.

O'Brien TP. 1981. The primary xylem. En "Xylem Cell Development" (Barnett JR, ed) pp 14-46, Tunbridge Wells, Castle House Publications Ltd.

Obara K, Kuriyama H y Fukuda H. 2001. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiol* 125:615-626.

Oliver MJ. 1996. Desiccation tolerance in vegetative plant cells. *Physiol Plant* 97: 779-787.

Osakabe K, Koyama H, Kawai S, Katayama Y y Morohoshi N. 1994. Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus kitakammiensis*. *Plant Sci* 103: 167-175.

Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP y Chang VL. 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8955-8960.

Østergaard L, Abelskov AK, Mattson O y Welinder KG. 1996. Structure and organ specificity of an anionic peroxidase from *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture. *FEBS Lett* 398: 243-247.

Østergaard L, Teilum K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M y Henriksen A. 2000. *Arabidopsis* ATP A2

peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant preoxidase with implications for lignification. *Plant Mol Biol* 44: 231-243.

Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Uría MA, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ y de Miguel MP. 1997. *Citología e histología vegetal y animal*. Ed McGraw-Hill Interamericana.

Pappas HS y Cass AEG. 1993. A step towards understanding the folding mechanism of horseradish peroxidase. Tryptophan fluorescence and circular dichroism equilibrium studies. *Eur J Biochem* 212:227-235.

Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.

Passardi F, Longet D, Penel C y Dunand C. 2004a. The plant peroxidase multigenic family in rice and its evolution in green plants. *Phytochemistry* 65: 1879-1893.

Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Surman C, Newman LJ, Smith C, Devan MW, Mansfield S, Whetten RW, Sderoff RR y Campbell MM. 2003. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J* 36: 743-754.

Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R y Ros Barceló A. 1993. A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in *Vitaceae*, *Solanaceae* and *Leguminosae*. En *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, eds KJ Welinder, SK Rasmussen, C Penel y H Greppin, Universidad de Ginebra, Ginebra pp 307-314.

Pennell RI y Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9:1157-1168.

Pesquet E, Jauneau A, Digonnet C, Boudet AM, Pichon M y Goffner D. 2003. *Zinnia elegans*: the missing link from *in vitro* tracheary elements to xylem. *Physiol Plant* 119: 463-468.

Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M y Goffner D. 2005. Novel markers of xylogenesis in *Zinnia* are differentially regulated by auxin and cytokinin. *Plant Physiol* 139: 1821-1839.

Peter G y Neale D. 2004. Molecular basis for the evolution of xylem lignification. *Curr Opin Plant Biol* 7: 737-742.

Polle A, Otter T y Seifert F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106: 53-60.

Pomar F, Merino F y Ros Barceló A. 2002. O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* 220: 17-28.

Popper ZA y Fry SC. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Ann Bot* 91: 1-12.

Popper ZA y Fry SC. 2004. Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. *New Phytologist* 164: 165-174.

Pryer KM, Schneider H, Smith HR, Cranfill R, Wolf PG, Hunt JS y Sipes SD. 2001. Horsetails and ferns are a monophyletic group and are the closest living relatives to seed plants. *Nature* 409: 616-622.

Pryer KM, Schuettpelz E, Wolf PG, Schneider H, Smith AR y Cranfill R. 2004. Phylogeny and evolution of ferns (monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany* 91: 1582-1598.

Qiu YL, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis PM, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V y Chase MW. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407.

Qiu YL y Palmer JD. 1999. Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes. *Trends Plant Sci* 4: 26-30.

Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H y Valpuesta V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127.

Rabilloud T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics* 2: 3-10.

Ragan MA. 1984. *Fucus* "lignin": a reassessment. *Phytochemistry* 23: 2029-2032.

Ragan MA y Glombitza KW. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog Phycol Res* 4: 129-241.

Ralph J, Hatfield RD, Quideae S, Helm RF, Grabber JH y Jung HJG. 1994. Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J Am Chem Soc* 116: 9448-9456.

Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH y Boerjan W. 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Rev* 3: 79-96.

Ralph J, Peng J, Lu F, Hatfield RD y Helm RF. 1999. Are lignins optically active? *J Agr Food Chem* 47: 2991-2996.

Raven JA. 1984. Physiological correlates of the morphology of early vascular plants. *Bot J Linn Soc* 88: 105-126.

Raven JA. 1987. The evolution of vascular land plants in relation to supracellular transport processes. *Adv Bot Res* 5: 153-219.

Raven JA. 1994. Physiological analyses of aspects of the functioning of vascular tissue in early plants. *Botanical Journal of Scotland* 47: 49-64.

Renzaglia KS, Dengate SJ, Schmitt SJ y Duckett JG. 2002. Novel features of *Equisetum arvense* spermatozoids: insights into pteridophyte evolution. *New Phytologist* 154: 159-174.

Renzaglia KS, Duff RJ, Nickrent DL y Garbary DJ. 2000. Vetegetative and reproductive innovaci3ns of early land plants: implications for a unified

phylogeny. Philosophical Transactions of the Royal Society London 355: 769-793.

Renzaglia KS, Johnson TH, Gates HD y Whittier DP. 2001. Architecture of the sperm cell of *Psilotum*. American Journal of Botany 88: 1151-1163.

Reznikow VM, Mikhaseva MF y Zilbergleit MA. 1978. The lignin of the alga *Fucus vesiculosus*. Chem Nat Comp 14: 554-556.

Riquelme A y Cardemil L. 1993. Peroxidases in the cell wall of seeds and seedlings of *Araucaria araucana*. Phytochemistry 32: 15-20.

Roth A, Mosbrugger V y Neugebauer HJ. 1994. Efficiency and evolution of water-transport systems in higher plants: a modeling approach. The earliest land plants. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B345: 137-152.

Roth-Nebelsick A, Grimm G, Mosbrugger V, Hass H y Kerp H. 2000. Morphometric analysis of *Rhynia* and *Asteroxylon*: testing functional aspects of early land plant evolution. Paleobiology 26: 405-418.

Roberts AW, Koonce LT y Haigler CH. 1992. A simplified medium for in vitro tracheary element differentiation in mesophyll suspension cultures from *Zinnia elegans* L. Plant Cell, Tiss Organ Cult 28:27-35.

Roberts AW y Haigler CH. 1994. Cell expansion and tracheary element differentiation are regulated by extracellular pH in mesophyll cultures of *Zinnia elegans* L. Plant Physiol 105: 699-706.

Roberts K y McCann MC. 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. Curr Opin Plant Biol 3: 517-522.

Roberts LW, Gahan PB y Aloni R. 1988. Vascular differentiation and plant growth regulators. Berlin, Springer-Verlag.

Rogers LA y Campbell MM. 2004. The genetic control of lignin deposition Turing plant growth and development. New Phytol 164: 17-30.

Rogers LA, Dubos C, Surman C, Willment J, Cullis IF, Mansfield SD y Campbell MM. 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. New Phytol 168: 123-140.

Ros Barceló A. 1995. Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. Protoplasma 186: 41-44.

Ros Barceló A. 1997. Lignification in plant cell walls. Int Rev Cytol 176: 87-132.

Ros Barceló A. 1998a. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. Planta 207: 207-216.

Ros Barceló A. 1998b. Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. Ann Bot 82: 97-103.

Ros Barceló A, Ferrer MA, García-Florenciano E y Muñoz R. 1991. The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pl in *Lupinus*. Bot Acta 104: 272-278.

Ros Barceló A, Gabaldón C, Gómez-Ros L, López Núñez-Flores M, Novo Uzal E, Zapata JM, Esteban Carrasco A, Gutiérrez J, Díaz J, Cuello J y Sottomayor M. The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains cis-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Finlandia, 2008.

Ros Barceló A, Gómez-Ros LV y Esteban Carrasco A. 2007. Looking for syringyl peroxidases. Trends Plant Sci 12: 486-491.

Ros Barceló A, Gómez-Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS y Pedreño MA. 2004. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? Phytochemistry Rev 3: 61-78.

Ros Barceló A, Morales M y Pedreño MA. 1997. Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. En *Lignin and Lignan Biosynthesis*, N.G. Lewis y S. Sarkanen, eds, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington 697: 84-95.

Ros Barceló A y Muñoz R. 1989. Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in *Lupinus*. Phytochemistry 28: 1331-1333.

Ros Barceló A, Muñoz R y Sabater F. 1987. Lupin peroxidases I. Isolation and characterization of cell wall bound isoperoxidase activity. Physiol Plant 71: 448-454.

Ros Barceló A, Muñoz R y Sabater F. 1988. Lupin peroxidases III. Subcellular location of membrane-bound acidic isoperoxidases. Plant Physiol Biochem 26: 575-583.

Ros Barceló A, Paradiso A y Pomar F. 2003. Heterogeneity in lignin monomer composition between gymnosperms and angiosperms is satisfied by means of a multifunctional basic peroxidase isoenzyme responsible for the polymerization step. En "12th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry" pp 253-256, Madison, Wisconsin USA.

Ros Barceló A y Pomar F. 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. Phytochemistry 57: 1105-1113.

Ros Barceló A y Pomar F. 2003. Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for the polymerisation of cinnamyl alcohols in the secondary cell wall of xylem vessels as another example of cell-to-cell cooperation during lignin biosynthesis. En "Plant Biology 2003 -Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists" pp 258 Honolulu, Hawaii USA.

Ros Barceló A, Pomar F y Pedreño MA. 2000. Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Z. elegans* xylem. Aust J Plant Phys 27: 1101-1107.

Ros Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P y Pedreño MA. 2002. Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a

basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol Biochem* 40: 325-332.

Rudolph H, Samland J. 1985. Occurrence and metabolism of sphagnum acid in the cell walls of bryophytes. *Phytochemistry* 24:745-749.

Ruel K, Montiel MD, Goujon T, Jouanin L, Burlat V y Joseleau JP. 2002. Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls. *Plant Biol* 4: 2-8.

Russell WR, Forrester AR, Chesson A y Burkitt MJ. 1996. Oxidative coupling during lignin polymerisation is determined by unpaired electron delocalisation within parent phenylpropanoid radicals. *Arch Biochem Biophys* 332:357-366.

Sablowski RW, Moyano E, Cufianez-Macía FA, Schuch W, Martin C y Bevan M. 1994. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthesis genes. *EMBO J* 13: 128-137.

Sachs T. 2000. Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. *Plant Cell Physiol* 41:649-656.

Sánchez-Romero C, García-Gómez ML, Pliego-Alfaro F y Heredia A. 1994. Effect of partial deglycosylation on catalytic characteristics and stability of an avocado peroxidase. *Physiol Plant* 92: 97-101.

Sarkanen KV y Ludwig CH. 1971. Definition and nomenclature. In Sarkanen KV y Ludwig (Eds.), *Lignins. Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Wiley Interscience, New York, 1-41.

Sasaki S, Baba K, Nishida T, Tsutsumi Y y Kondo R. 2006. The cationic cell-wall-peroxidase having oxidation ability for polymeric substrates participates in the late stage of lignification of *Populus alba* L. *Plant Mol Biol* 62: 797-807.

Satterthwait DF y Schopf JW. 1972. Structurally preserved phloem zone tissue in *Rhynia*. *American Journal of Botany* 59: 373-376.

Sato Y, Sugiyama M, Komamine A y Fukuda H. 1995a. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta* 196: 141-147.

Scheirer DC. 1980. Differentiation of bryophyte conducting tissues: structure and histochemistry. *Bull Torrey Bot Club* 107: 298-307.

Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizadeh H y Lamport DTA. 1996. Isolation of pI 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J* 9: 477-489.

Schneider EL y Carlquist S. 2000. SEM studies on vessels in ferns. 17. *Psilotaceae*. *American Journal of Botany* 87: 176-181.

Schultz CJ, Ferguson KL, Lahnstein J y Bacic A. 2004. Post-translational modifications of arabinogalactan-peptides of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 45503-45511.

Schweingruber FH. 1990. Microscopic wood anatomy. Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research, London.

Shigeoka S, Nakano Y y Kitakoa S. 1980. Purification and properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis*. Z. Arch Biochem Biophys 201: 121-127.

Siegel SM. 1969. Evidence for the presence of lignin in moss gametophytes. American Journal of Botany 56: 175-179.

Siegel BZ. 1993. Plant peroxidases – an organismic perspective. Plant Growth Regul 12: 303-312.

Smith A y Veitch NC. 1998. Substrate binding and catálisis in heme peroxidases. Curr Opin Chem Biol 2: 269-278.

Sørensen I, Pettolino FA, Wilson SM, Doblin MS, Johansen B, Bacic A y Willats WGT. 2008. Mixed-linkage (1→3),(1→4)-β-D-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of *Equisetum arvense* cell walls. The Plant Journal 54: 510-521.

Sottomayor M y Ros Barceló A. 1997. What can we learn from α-3', 4'-anhydrovinblastine synthase? Recent Res Develop Phytochem Vol I, SG Pandalai, ed Research Signpost, India 1: 225-233.

Speck TS y Vogellehner D. 1988. Biophysical examinations of the bending stability of various stele types and the upright axes of early "vascular" land plants. Bot Acta 101: 262-268.

Speicher A, Heisel R y Kolz J. 2003. First detection of a chloroperoxidase in bryophytes. Phytochemistry 62: 679-682.

Sperry JS. 2003. Evolution of water transport and xylem structure. Int J Plant Sci 164: 115-127.

Sperry JS, Hacke UG y Wheeler JK. 2005. Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. Plant Cell Environ 28: 456-465.

Stacey NJ, Roberts K, Carpita NC, Wells B y McCann MC. 1995. Dynamic changes in cell surface molecules are very early events in the differentiation of mesophyll cells from *Zinnia elegans* into tracheary elements. Plant J 8: 891-906.

Stein W. 1993. Modeling the evolution of stellar architecture in vascular plants. International Journal of Plant Sciences 154: 229-263.

Stewart WN y Rothwell GW. 1993. Paleobotany and the evolution of plants. Cambridge University Press. Cambridge.

Stracke R, Weber M y Weisshaar B. 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. Curr Opin Plant Biol 4: 447-456.

Strivastava LM. 1966. Histochemical studies on lignin. Tappi 49: 173-183.

Sugiyama M y Fukuda H. 1995. *Zinnia* mesophyll culture system to study xylogenesis. En "Plant Tissue Culture Manual H2" pp 1-15, Kluwer Academic Publishers.

Sugiyama M y Komamine A. 1990. Transdifferentiation of quiescent parenchymatous cells into tracheary elements. *Cell Differ Dev* 31:77-87

Takahama U. 1993. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolic by ascorbic acid: Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol* 34: 809-817.

Takahama U. 1995. Oxidation of hydroxycinnamic acid and hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase. Interactions among *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiol Plant* 93: 61-68.

Takahama U, Oniki T y Shimokawa H. 1996. A possible mechanism for the oxidation of sinapyl alcohol by peroxidase-dependent reactions in the apoplast: enhancement of the oxidation by hydroxycinnamic acids and components of the apoplast. *Plant Cell Physiol* 37:499-504

Tamagnone L, Merida A, Parr A, Mackay S, Culianez-Macis FA, Roberts K y Martin C. 1998. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* 10: 135-154.

Tams JW y Welinder KG. 1995. Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal Biochem* 228: 48-55.

Tarkka MT, Nyman TA, Kalkkinen N y Raudaskoski M. 2001. Scots pine expresses short-root-specific peroxidases during development. *Eur J Biochem* 268: 86-92.

Teichmann T, Guan C, Kristoffersen P, Muster G, Tietz O y Palme K. 1997. Cloning a biochemical characterization of an anionic peroxidase from *Zea mays*. *Eur J Biochem* 247: 826-832.

Terashima N y Fukushima K. 1988. Heterogeneity in formation of lignin. XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci Technol* 22: 259–270.

Terashima N y Fukushima K. 1989. Biogenesis and structure of macromolecular lignin in cell wall of tree xylem as studied by microautoradiography. En “Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation” (Lewis NG, Paice, eds) ACS Symp Series 399:160-168 Am Chem Soc, Washington DC.

Thelen MP y Northcote DH. 1989. Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L.: a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* 179:181-195.

Tognolli M, Penel C, Greppin H y Simon P. 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.

Tokunaga N, Sakakibara N, Umezawa T, Ito Y, Fukuda H y Sato Y. 2005. Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary

element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 46: 224-232.

Tsutsumi Y, Matsui K y Sakai K. 1998. Substrate-specific peroxidases in woody angiosperms and gymnosperms participate in regulating the dehydrogenative polymerization of syringil and guaiacyl type lignins. *Holzforschung* 52: 275-281.

Tsutsumi Y, Nishida T y Sakai K. 1994. Lignin biosynthesis in woody angiosperm tissues III. Isolation of substrate-specific peroxidases related to the dehydrogenative polymerization of sinapyl and coniferyl alcohols from *Populus* callus cultures. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 1348-1354.

Tutschek R. 1979. Characterization of a peroxidase from *Sphagnum megallanicum*. *Phytochemistry* 18: 1437-1439.

Tyson H y Dhindsa R. 1995. Codon usage in plant peroxidase genes. *DNA Seq* 5: 339-351.

Ubeda-Tomas S, Edvardsson E, Eland C, Kumar Singh S, Zadik D, Aspeborg H, Gorzsàs A, Teeri TT, Sundberg B, Persson P, Bennett M y Marchant A. 2007. Genomic-assisted identification of genes involved in secondary growth in *Arabidopsis* utilising transcript profiling of poplar wood-forming tissues. *Physiol Plantarum* 129: 415-428.

Ujino-Ihara T, Kanamori H, Yamane H, Taguchi Y, Namiki N, Mukai Y, Yoshimura K y Tsumura Y. 2005. Comparative analysis of expressed sequence tags of conifers and angiosperms reveals sequences specifically conserved in conifers. *Plant Molecular Biology* 59: 895-907.

Valerio L, De Meyer M, Penel C y Dunand C. 2004. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* 65: 1331-1342.

Vanden Driessche T, Kevers C, Gaspar T y Caubergs R. 1984. Peroxidases in *Acetabularia*: their possible role in development. *Differentiation* 27: 175-181.

Varner JE y Lin LS. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.

Vincent JVF y Jeronimidis G. 1991. The mechanical design of fossil plants. In *Biomechanics and evolution*. Rayner JMV y Wootten RJ, edits. Cambridge University Press. Cambridge.

Wächter D, Rudolph H, Völker H. 1987. Peroxidative degradation of sphagnum acid (*p*-hydroxy- β -[carboxymethyl]-cinnamic acid). *J Plant Physiol* 126: 449-456.

Weger HG. 1997. Interactions between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity. *Phytochemistry* 46: 195-201.

Weisshaar B y Jenkins GI. 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* 1: 251-257.

Welinder K. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.

- Welinder KG, Justesen AF, Kjærsgård IVH, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM y Duroux L.** 2002 Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. Eur J Biochem 269: 6063-6081.
- Whetten R y Sederoff RR.** 1995. Lignin biosynthesis. Plant Cell 7: 1001-1013.
- White E y Towers GHN.** 1967. Lignin and certain other chemical constituents of *Phylloglossum*. Nature 213: 285-286.
- Wight DC.** 1987. Non-adaptative change in early land plant evolution. Paleobiology 13: 208-214.
- Wilson IBH.** 2002. Glycosilation of proteins in plants and invertebrates. Curr Opin Struc Biol 12: 569-577.
- Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV y Koonin EV.** 2002. Genome trees and the Tree of Life. Trends in Genetics 18: 472-479.
- Yang BY, Gray JSS y Montgomery R.** 1996. The glycans of horseradish peroxidase. Carbohydrate Res 287: 203-212.
- Yokoyama R y Nishitani K.** 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls. J Plant Res 119: 189-194.
- Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A y Shinmyo A.** 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. Appl Microbiol Biotechnol 60: 665-670.
- Zamocky M.** 2004. Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. Eur J. Biochem 271: 3297-3309.
- Zhong R, Taylor JJ y Ye ZH.** 1997. Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. Plant Cell 9: 2159-2170.
- Zimmermann MH.** 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer-Verlag. New York. USA.